



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**MIKROBIÁLNÍ PRODUKCE LIPIDICKÝCH LÁTEK S
VYUŽITÍM ODPADNÍCH SUBSTRÁTŮ**

MICROBIAL PRODUCTION OF LIPID SUBSTANCES USING WASTE SUBSTRATES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Árendášová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1454/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Veronika Árendášová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Mikrobiální produkce lipidických látek s využitím odpadních substrátů

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Rešerše – přehled mikrobiálních producentů významných lipidů, možnosti řízení produkce lipidů
- 2) Produkce lipidických látek kvasinkami rodu *Metschnikowia* s využitím modifikace podmínek kultivačního média
- 3) Využití odpadních substrátů jako zdrojů uhlíka ke kultivaci kvasinek
- 4) Analýza metabolitů instrumentálními technikami

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Veronika Árendášová
student(ka)

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Predložená bakalárska práca je zameraná na produkciu lipidov prostredníctvom vybraných kmeňov rodu *Metschnikowia* zo škrobových odpadných substrátov. Vyprodukované lipidy majú široké využitie v biotechnologických procesoch. Na kultiváciu boli využité odpadné škrobové substráty z potravinárskej výroby, ktoré sú dostupným a ekonomicky výhodným materiálom. V rámci práce bol sledovaný aj rast jednotlivých kmeňov *Metschnikowia* na optimálnom médiu pri laboratórnej a zníženej teplote. Produkčné vlastnosti kvasiniek boli analyzované plynovou chromatografiou. Všetky vybrané kmene rodu *Metschnikowia* boli schopné produkovať lipidy za využitia odpadných substrátov. Vyššia produktivita lipidov bola pri použití zmesi zloženej z glukózy a odpadného substrátu. Množstvo lipidov a zastúpenie mastných kyselín veľmi záviselo od kmeňa a kultivačných podmienok. U všetkých študovaných kmeňov bolo najväčšie zastúpenie mononenasýtených mastných kyselín. Najlepšie sa na odpadné substráty adaptoval kmeň *Metschnikowia pulcherima* 149.

ABSTRACT

This bachelor's thesis examines the issue of lipid production, done through selected *Metschnikowia* strains gained from waste starch substrates. Produced lipids are extensively used in biotechnological processes. Cultivation utilised waste starch substrates, left over from food production, as they constituted an available and economical material. The study also monitored the growth of individual *Metschnikowia* strains in laboratory and reduced temperatures, using an optimal medium. The yeast's production properties were analysed by means of gas chromatography. All selected *Metschnikowia* strains were able to produce lipid from waste substrates. Lipid production increased when a mixture of glucose and waste substrates was used. The amount of lipids and the share of fatty acids strongly depended on the strain and cultivation conditions. In all examined strains, monounsaturated fatty acids were represented most strongly. The *Metschnikowia pulcherima* 149 adapted best to waste substrates.

KLÚČOVÉ SLOVA

rastová krivka, lipidy, *Metschnikowia pulcherima*, odpadné substráty z potravinárskej výroby

KEY WORDS

growth curve, lipids, *Metschnikowia pulcherima*, food production waste substrates

ÁRENDÁSOVÁ, Veronika. Mikrobiální produkce lipidických látek s využitím odpadních substrátů [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-20]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113475>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Hároniková.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením vedúcej bakalárskej práce, a že všetky použité zdroje som citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študentky

POĎAKOVANIE

Rada by som sa poďakovala svojej vedúcej bakalárskej práce, Ing. Andrei Háronikovej, Ph.D., za odborné vedenie, cenné rady, informácie, usmernenie pri písaní mojej práce a za trpezlivosť a ochotu. Ďalej chcem poďakovať všetkým, ktorí mi akýmkoľvek spôsobom pomohli pri spracovaní tejto bakalárskej práce. A v neposlednej rade by som sa chcela poďakovať mojej rodine za pomoc počas celého štúdia.

OBSAH

OBSAH	5
1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
2.1 Rast a kultivácia mikroorganizmov	8
2.1.1 Spôsoby kultivácie	8
2.1.2 Živné média.....	8
2.1.3 Rastová krivka.....	9
2.1.4 Stanovenie biomasy.....	10
2.2 Kvasinky	10
2.2.1 Výskyt kvasiniek a význam.....	10
2.2.2 Rast kvasiniek	11
2.3 Kvasinky rodu <i>Metschnikowia</i>	11
2.3.1 Metabolické produkty rodu <i>Metschnikowia</i>	12
2.3.2 Výskum rodu <i>Metschnikowia</i>	14
2.4 Odpadné substráty z potravinárskych výrobní	15
2.4.1 Slama.....	16
2.5 Lipidy.....	16
2.5.1 Štruktúra lipidov.....	16
2.5.2 Biosyntéza mastných kyselín	17
2.5.3 Produkcia lipidov kvasinkami	18
2.5.4 Produkcia lipidov prostredníctvom rodu <i>Metschnikowia</i> za využitia odpadných substrátov	19
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	21
3.1 Použité chemikálie, prístroje a pomôcky.....	21
3.1.1 Použité chemikálie:	21
3.1.2 Prístroje a pomôcky:.....	21
3.1.3 Kvasinkové kmene:	22
3.2 Kultivácia kvasiniek rodu <i>Metschnikowia</i>	23
3.2.1 Kultivačné médium:	23
3.3 Rastová krivka	23
3.3.1 Príprava kultivačných médií.....	23
3.3.2 Stanovenie množstva biomasy turbidimetricky	24
3.3.3 Gravimetrické stanovenie množstva biomasy	24
3.4 Analytické a separačné metódy	24
3.4.1 Charakterizácia biologického materiálu	24
3.4.2 Príprava vzorku	24
3.4.3 Extrakcia sacharidov	25
3.4.4 Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboise.....	25
3.4.5 Stanovenie redukujúcich sacharidov podľa Somogyi-Nelsona.....	25
3.5 Produkcia lipidov prostredníctvom rodu <i>Metschnikowia</i> za využitia odpadných substrátov	26
3.5.1 Spracovanie a stanovenie množstva biomasy spektrofotometricky	27
3.5.2 Gravimetrické stanovenie biomasy pre plynovú chromatografiu	27
3.5.3 Transesterifikácia lipidov	27

3.5.4	Analýza lipidov	28
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	29
4.1	Rastová krivka	29
4.1.1	Závislosť nárastu sušiny na čase	29
4.2	Extrakcia a analýza odpadných substrátov	31
4.2.1	Analýza celkových sacharidov podľa Duboise	31
4.2.2	Analýza redukujúcich sacharidov podľa Somogyi-Nelsona	32
4.3	Produkcia lipidov kvasinkami rodu <i>Metschnikowia</i>	33
4.3.1	Vplyv uhlíkového substrátu na produkčné vlastnosti rodu <i>Metschnikowia</i>	34
4.3.2	Produkcia biomasy a lipidov v závislosti na použitom zdroji uhlíka.....	34
4.3.3	Zastúpenie mastných kyselín v závislosti na teplote.....	40
5	ZÁVER.....	42
	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	43
	ZOZNAM SKRATIEK	46
	PRÍLOHY	47

1 ÚVOD

V biotechnologických produkciách mikrobiálnych metabolitov sú najvyužívanjšími mikroorganizmami kvasinky, ktoré poskytujú široké využitie v rôznych odvetviach priemyslu. Kvasinky majú uplatnenie aj v medicíne a vede. Nezastupiteľné miesto majú oleogénne kvasinky. Oleogénne kvasinky majú široké uplatnenie v biotechnologickom priemysle. Hlavným dôvodom je schopnosť produkovať lipidy a najmä nenasýtené mastné kyseliny, ktoré sú zložením podobné rastlinným olejom. Palmový olej sa využíva v kozmetike, potravinárskom priemysle a ako prísada do biopalív. V posledných 30 rokoch patrí medzi najpoužívanjší rastlinný olej. Čo súvisí aj s environmentálnou katastrofou, s ktorou je spojené pestovanie paliem, a tým spojený výrub dažďových pralesov. Oleogénne kvasinky produkujú mikrobiálnych lipidov s podobným zložením ako palmový olej, poskytujú potenciál na výrobu náhrady palmového oleja. Nájdenie vhodnej náhrady za palmový olej môže znateľne vyriešiť ekologický problém. V poslednej dobe je produkován veľké množstvo odpadov z poľnohospodárskeho a potravinárskeho priemyslu. Tieto odpadné substráty sú bohatým zdrojom uhlíka, čo má využitie pri kultivácii oleogénnych kvasiniek, ktoré sú schopné na týchto substrátoch rásť. Schopnosť oleogénnych kvasiniek rásť na rôznych typoch odpadných substrátov výrazne znižuje náklady na kultiváciu.

Cieľom bakalárskej práce je štúdium produkcie lipidov vybranými piatimi kmeňmi kvasiniek rodu *Metschnikowia*. V rámci štúdie bol sledovaný rast a produkcia lipidov pri použití troch odpadných substrátov z potravinárskej výroby. Pri štúdií bola prevedená kultivácia na médiu zloženom z glukózy a odpadného substrátu v pomere 1:1 a na médiu zloženého čisto z odpadných substrátov. Počas práce bol sledovaný aj rast kvasiniek na optimálnom médiu pri laboratórnej a zníženej teplote. V závere bola zhodnotená produkcia biomasy a lipidov v závislosti na použití odpadných substrátov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Rast a kultivácia mikroorganizmov

Rast mikroorganizmov sa sleduje pri optimálnych podmienkach pri procese kultivácie. Kultivácia zahŕňa naočkovanie inokula do živného média a následnú inkubáciu pri optimálnej teplote a dobe [1, 2].

2.1.1 Spôsoby kultivácie

- Statická kultivácia – mikroorganizmy sú naočkované do určitého objemu tekutého živného média alebo na povrch tuhého média, pričom sú v priebehu rastu postupne vyčerpané živiny a hromadia sa splodiny metabolizmu, ktoré často môžu inhibovať rast [1].
- Submerzná kultivácia – prebieha v tekutom živnom médiu, ktoré je neustále premiešavané (na trepačke) a prevzdušňované. Rast prebieha rýchlejšie, preto dodnes sa v priemysle využíva vo fermentoroch [1].
- Kontinuálna kultivácia – na rozdiel od statickej a submerznej kultivácie je možné zaistenie konštantnosti tým, že k rastúcej kultúre mikroorganizmov pritekajú živiny a odteká rovnaký objem média s vyrastenými mikroorganizmami. Zvolením vhodnej rýchlosti prítoku možno dosiahnuť rovnovážny stav, kedy sa situácia v inkubačnej nádobe nemení a v celom objeme živného média je udržiavaný konštantný počet buniek (je tak laboratórnym modelom, ktorý sa najviac približuje prirodzeným podmienkam v prírode) [1].

Rozdelenie z hľadiska nárokov mikroorganizmov na prítomnosť kyslíka:

- a) aeróbna kultivácia – pri kultivácii mikroorganizmus vyžaduje prítomnosť vzdušného kyslíka, ktorý sa buď prirodzene dostáva do živného média alebo pri malých objemoch je regulovaný tvarom nádoby [1].
- b) anaeróbna kultivácia – mikroorganizmus nevyžaduje pri kultivácii prítomnosť vzdušného kyslíka, a preto je zamedzený prístup kyslíka odčerpávaním vzduchu, použitím nádoby so vzduchotesným uzavretím alebo do živného média sa pridávajú redukujúce látky, aby kyslík odčerpali z média [1].

2.1.2 Živné média

Mikroorganizmy potrebujú na rast a rozmnožovanie vhodnú výživu, ktorú získavajú zo živného prostredia. Živné médium musí splňovať určité podmienky v závislosti na požiadavkách daného mikroorganizmu. Musí byť teda tak upravené, aby čo najviac simuloval prirodzené prostredie daného mikroorganizmu. Čím bude mať mikroorganizmus živné médium s bližším zložením jeho prirodzeného prostredia, tým lepšie sa mu bude dariť za laboratórných podmienok. K základným zložkám výživy kvasiniek patrí voda, zdroj uhlíku, dusíku, kyslíku, vodíka, fosforu a horčíka, ďalej stopové prvky a rastové látky. Živné médium musí obsahovať dostatok vody, pre kvasinky najmenej 30 %. Najprístupnejší zdroj uhlíku pre živné média je vo forme jednoduchých sacharidov alebo polysacharidov. Okrem uhlíku sú sacharidy zdrojom vodíku a kyslíku. Kyslík pôsobí v médiu hlavne ako akceptor elektrónu pri

syntéze ATP, ale tiež zvyšuje výrazne redoxný potenciál prostredia, ktorý je nutný k rastu aeróbných mikroorganizmov. Môže byť tiež prijímaný voľne zo vzduchu. Ako zdroj dusíku môžu kvasinky využívať vzdušný dusík, dusičnany, dusitany, amónne soli či organický dusík viazaný v peptónoch, peptidoch alebo v kvasničných autolyzátach. Dôležitú úlohu v živnom médiu zohráva aj fosfor a horčík. Hlavnou úlohou fosforu je zaistenie prenosu energie. Jeho nedostatok spôsobuje spomalenie rastu alebo fermentačných procesov mikroorganizmu. Horčík je stimulátor enzýmových procesov, a tiež podporuje aktivitu fosfatáz. Ďalšie biogénne prvky ako vápnik, draslík, železo, zinok, chlór, meď, kobalt, nikel, jód a bór sú pridávané do média len v malých koncentráciách, lebo pri nesprávnom pomere a vysokých koncentráciách môžu pôsobiť toxicky [1, 3].

2.1.3 Rastová krivka

Grafické znázornenie rastu kultúry v závislosti na čase. Rastová krivka môže byť rozdelená na niekoľko fáz (Obrázok 1). Prvá fáza, tzv. lag-fáza (I), bunky sa nerozmnožujú len sa prispôbujú novému prostrediu, zväčšujú svoj objem a aktivuje sa ich enzýmový aparát. Z priemyslového hľadiska je táto fáza nežiadúca, a preto sa ju snažia čo najviac skrátiť [4, 5].

$$\frac{dX}{dt} \approx 0 \quad (2.1)$$

Fáza zrýchleného rastu (II) sa spojuje s fázou exponenciálneho rastu (III). V exponenciálnej fáze dochádza k neobmedzenému rastu a rozmnožovaniu. V tejto fáze je merná rastová rýchlosť maximálna. Bunky majú najkratšiu generačnú dobu (čas potrebný na zdvojnásobenie počtu buniek v kultúre) [4, 5].

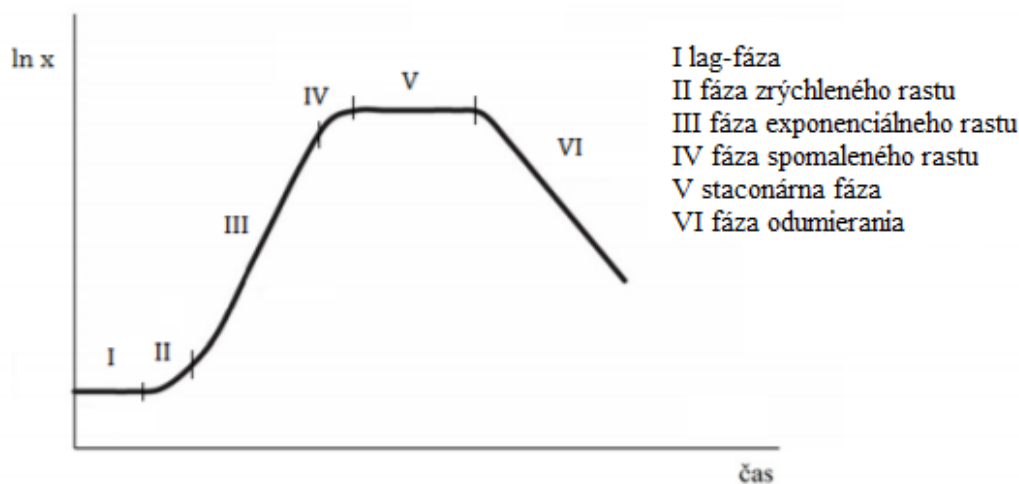
$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (2.2)$$

Keď niektorá zo živín začne byť limitujúca, dochádza k zníženiu rýchlosti rastu a rozmnožovania. Kultúra dosiahne fázu spomaleného rastu (IV). Následne systém začne vstupovať do stacionárnej fázy (V), keď počet buniek vzniknutých kompenzuje počet buniek odumierajúcich. Dochádza k produkcii sekundárnych metabolitov [5].

$$\frac{dX}{dt} \approx 0 \quad (2.3)$$

Posledná fáza je fáza odumierania (VI), kde podiel počtu živých a mŕtvych buniek klesá. Z technologického hľadiska je táto fáza nežiadúca, a preto spravidla býva kultivácia ukončená ešte pred jej dosiahnutím [4].

$$\mu_D = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (2.4)$$



Obrázok 1: Rastová krivka s vyznačenými fázami [5]

2.1.4 Stanovenie biomasy

V mikrobiologickej praxi je často nutné vyhodnotiť rast a množenie mikroorganizmov, čo má veľký význam predovšetkým v kvasnom priemysle s využitím pre bilanciu fermentačných procesov. V základnom výskume slúži stanovenie počtu buniek pre posúdenie kinetiky rastu, ako aj pre stanovenie špecifickej rýchlosti rastu a rozmnožovania v jednotlivých fázach ich vývoja. V kontrolných laboratóriách sa používa pre kontrolu mikrobiálneho znečistenia rôznych materiálov [1].

2.1.4.1 Stanovenie sušiny

Stanovenie bunkovej hmoty (sušiny) mikroorganizmov má v mikrobiológii hlavné využitie pri biochemických prácach a pri konštrukcii rastových kriviek. Význam má jedine vtedy, ak kultúry rastú na čírych živných pôdach, a len vtedy je možné získať spoľahlivé výsledky. V prípade živných médií obsahujúcich pevné častice alebo zrazeniny sa od hodnoty suchej hmotnosti vzorky s mikroorganizmami (sušenej do konštantnej hmotnosti pri 105 °C a ochladenej na izbovú teplotu v exsikátore) odčíta suchá hmotnosť pevných častíc nezaočkovaného média [1].

2.2 Kvasinky

Kvasinky sú heterotrofné eukaryotické organizmy patriace do ríše *Fungi*. Ich bunka má spravidla elipsovité až guľovité tvar. Vyskytujú sa buď samostatne, alebo spojené v kolóniách [5].

2.2.1 Výskyt kvasiniek a význam

Kvasinky sú prítomné vo vode, pôde, vzduchu, na rastlinách, na živočíchoch, a tiež ich môžeme nájsť aj v potravinách. Kvasinky sú v prírode veľmi rozšírené. Kvôli svojim sacharolytickým schopnostiam sa vyskytujú predovšetkým na materiáloch obsahujúcich cukry, t.j. na ovocí a cukornatých potravinách. Ďalej sa nachádzajú v kvetných nektároch, kde bývajú najčastejšie prítomné oxidačné typy. Kvasinky nemajú schopnosť štiepiť bielkoviny,

preto sa nemnožia vo väčšej miere na mäse a inom bielkovinovom materiáli. Môžu byť nežiaducimi kontaminantami a niektoré patogénne kvasinky môžu spôsobiť vážne ochorenia. Výskyt kvasiniek tiež ovplyvňuje ich nízka tepelná odolnosť. Hlavný priemyslový význam kvasiniek spočíva v ich využití pre výrobu alkoholických nápojov a pekárskoho, či kŕmneho droždía [5, 6].

2.2.2 Rast kvasiniek

2.2.2.1 Fyzikálne požiadavky

Mikroorganizmy sú vystavené mnohým faktorom z prostredia ako napríklad teplote, vodnému potenciálu, pH, tlaku, radiácií, kyselinám a vplyvu iných mikroorganizmov. Teplota je jedným z najdôležitejších fyzikálnych parametrov, ktoré ovplyvňujú rast. Podľa optimálnych teplôt, kvasinky rozdeľujeme na psychrofilné, mezofilné a termofilné. Rast kvasiniek tiež ovplyvňuje pH prostredia. Veľa kvasiniek dobre rastie v pH 4,5 až 6,5. Rovnako ako v prípade teploty majú kvasinky hodnoty aj pre vodný potenciál (minimálna, optimálna a maximálna). Mnohé mikroorganizmy existujú aj pod hypotonickými alebo izotonickými podmienkami [7].

2.2.2.2 Nutričné požiadavky

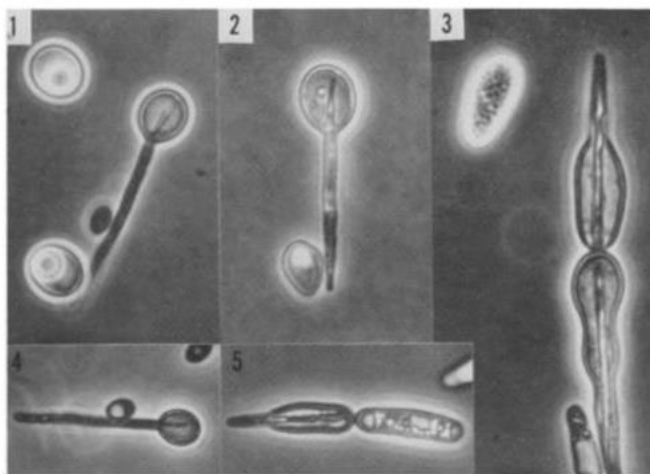
Elementárne zloženie kvasinkových buniek nám napovedá o nutričných požiadavkách kvasiniek. Kvasinky získavajú esenciálne prvky z ich rastového prostredia, napríklad z jednoduchých potravinárskych zdrojov, ktoré majú k dispozícii makronutrienty ako sú C, H, O, N, P, K, Mg a S alebo mikronutrienty, ako sú stopové prvky. Kvasinky sú chemoorganotrofné organizmy, ktoré využívajú organické komponenty ako zdroj uhlíka a energie [7].

2.2.2.3 Vplyv vonkajšieho prostredia na kvasinky

Zo Slnka na Zem prúdia neustále rôzne formy elektromagnetického žiarenia (viditeľné svetlo, infračervené a ultrafialové žiarenie). Toxické produkty kyslíka produkované v kontakte so svetlom často poškodzujú kvasinky [7].

2.3 Kvasinky rodu *Metschnikowia*

Kvasinky rodu *Metschnikowia* sú v prírode pomerne dosť rozšírené. Niektoré druhy sa vyskytujú voľne v prírode, iné boli izolované z ovocia, kvetov, hmyzu aj z kože človeka. Rod *Metschnikowia* patrí do čeľade *Metschnikowiaceae*. Je charakteristický tvorbou jedného alebo dvoch askospór ihlovitého tvaru (Obrázok 2) zakončených hrotom na jednom alebo oboch koncoch, bez bičíkovitého prívěsku, ktoré sú umiestnené v pretiahnutom asku. Z dôvodu tvorby askospór sú kvasinky rodu *Metschnikowia* radené do oddelenia *Ascomycotina* [8, 9].



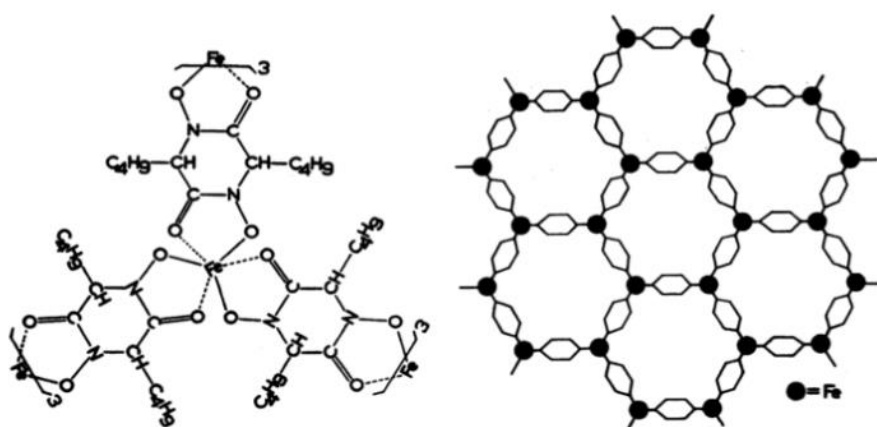
Obrázok 2: Metschnikowia askospóry ihlovitého tvaru [10]

2.3.1 Metabolické produkty rodu *Metschnikowia*

Mikroorganizmy vo všeobecnosti produkujú počas fermentácie rad rôznych metabolických zlúčenín, ktoré sú buď medziproduktmi, ktoré sa neskôr používajú v organizme na niektoré ďalšie funkcie, alebo sú vedľajšími produktmi, ktoré sa dajú zhromaždiť. Zistilo sa, že *Metschnikowia pulcherrima* produkuje spolu s 2-fenyletanolom dva ďalšie hlavné vedľajšie produkty, ktorými sú arabitol a lipidy [11].

2.3.1.1 Pulcherrimin

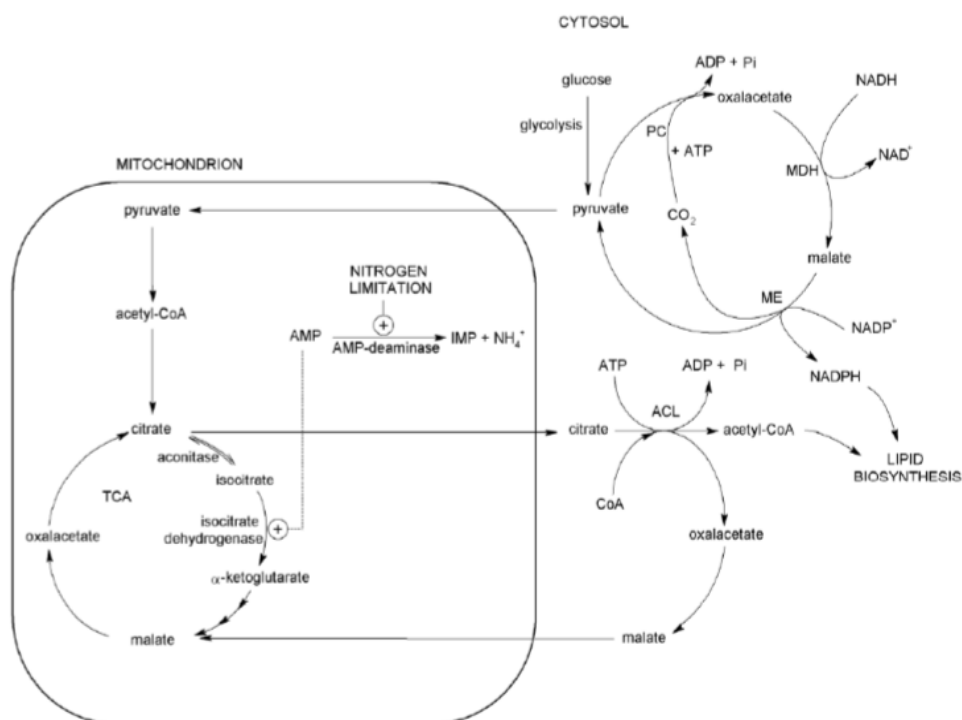
Pulcherrimin je čierno-červený pigment, ide o komplexnú štruktúru, zlúčeninu zo železa a kyseliny pulcherriminovej. Produkcia pulcherriminu je jedným z kľúčových mechanizmov identifikácie kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*. Tento pigment sa po kvasinke nazýva pulcherrimin (Obrázok 3). Beijerinck (1908) pozoroval, že produkcia červeného pulcherriminu v kultúre *Metschnikowia pulcherrima* môže byť zvýšená pridaním soli železa. Tvrdí sa, že produkcia pulcherriminu je mechanizmom bunky na zvládnutie prebytočného železa v kultivačnom médiu [10, 12].



Obrázok 3: Molekulová štruktúra pulcherriminu, ktorá je ukázaná ako komplexná zlúčenina železa a pulcherriminovej kyseliny [10]

2.3.1.2 Lipidy

Nedávno sa preukázalo, že olej vyrobený z *Metschnikowia pulcherrima* je podobný oleju z palmového oleja, preto by sa mohol použiť na substitúciu palmového oleja a znížilo by sa odlesňovanie pralesov, čo je následkom pestovania paliem na výrobu palmového oleja [13]. Produkcia lipidov pomocou oleogénnych mikroorganizmov závisí od zloženia kultivačného média. Musí byť v nadbytku zdroj uhlíka a limitujúce ďalšie faktory obmedzujúce rast buniek ako fosfor, vápnik, horčík, zinok a hlavne dusík. Pri biosyntéze mastných kyselín sa zdroj uhlíka v cytosole premieňa na pyruvát, pyruvát sa prepraví do mitochondrií, kde sa dekarboxyluje na acetyl-CoA, ktorý reaguje s oxalacetátom a potom ďalej citrátom a následne izo-citrátom v citrátovom cykle. V prípade obmedzenia dusíka sa aktivuje enzým AMP-deamináza štiepením adenosín-monofosfátu na inozín-monofosfát a amoniový kation, čím sa získa dusík. AMP sa však vyžaduje na funkčnosť enzýmu izocitrát-dehydrogenázy, ktorá konvertuje izo-citrát na alfa-ketoglutarát v citrátovom cykle, aby sa vytvoril $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ na výrobu ATP v rámci dýchacieho reťazca. Ak nie je k dispozícii žiadny AMP, izoluje sa izocitrát z mitochondrie. Kvôli rovnovážnym reakciám je izocitrát konvertovaný na citrát, ktorý sa hromadí aj v mitochondriách a je vedený do cytosolu prostredníctvom transportérov malátu alebo citrátu. V tomto bode sa citrát rozštiepi pri spotrebe ATP na oxalacetát a jednu jednotku acetyl-CoA, čo je chemický prekursor pre syntézu mastných kyselín. Táto konverzia sa uskutočňuje enzýmom ATP-citrát-lyasou, ktorý je špeciálne v olejnatých mikroorganizmoch. Rozsah produkcie mastných kyselín závisí od koncentrácie jablčného enzýmu, ktorý konvertuje malát na pyruvát pomocou uvoľňovania NADPH. Táto chemická konverzia je jediným zdrojom NADPH pre enzýmovú mastnú kyselinovú syntázu, ktorá sa vyžaduje pri biosyntéze mastných kyselín (Obrázok 4) [14, 15, 16].



Obrázok 4: Diagram biosyntézy mastných kyselín pomocou oleogénnych mikroorganizmov [17].

2.3.1.3 Arabitol

Arabitol (niekedy nazývaný arabinitol) je cukrový alkohol C5, ktorý sa bežne nenachádza v prevažnej väčšine fermentačných kvasiniek. Je to enantiomér xylitolu, ktorý sa bežne používa ako náhradné sladidlo v niekoľkých komerčných produktoch. Xylitol sa biochemicky vyrába hlavne z kvasiniek *Candida glabra*. Prvá priemyselná výroba xylitolu bola vo Fínsku a začala v roku 1975. Vyrábala sa väčšinou chemickými procesmi pri redukcii xylózy izolovanej z brezových stromov. Nový prístup k udržateľnejším postupom však viedol k vývoju biochemickej cesty, ktorá by mohla produkovať xylitol a potenciálne arabitol z glukózy. Arabitol by mohol slúžiť ako ďalší atraktívny bioprodukt, ktorý možno použiť ako sladidlo [11, 18].

2.3.1.4 2-fenyletanol

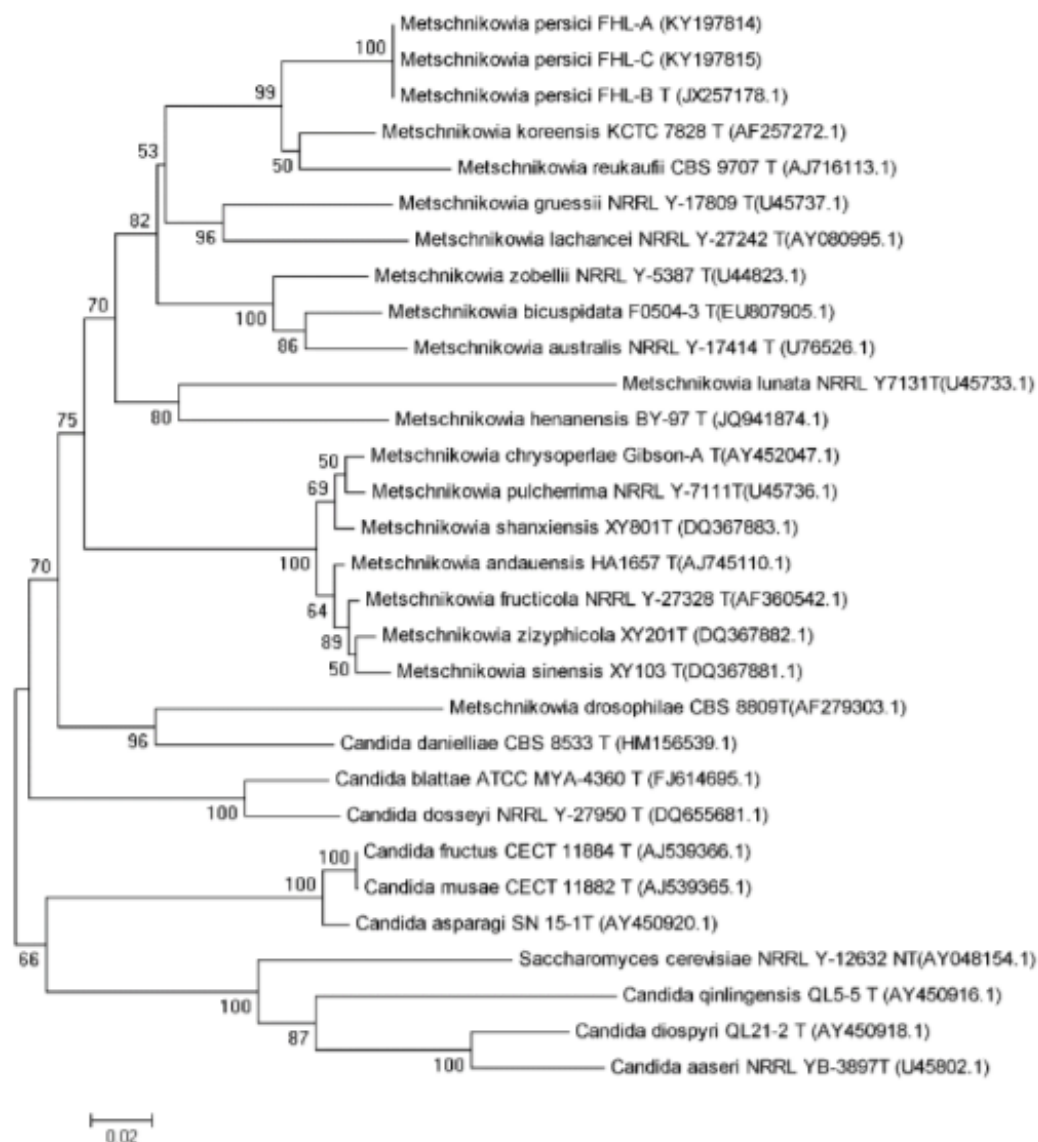
Vyšší aromatický alkohol (C₈H₉OH), ktorý má chuť a vôňu podobnú ružiam. Je to jedna z hlavných zložiek pre parfumy a ružové voňavé potravinárske výrobky po celom svete. Prirodzenou cestou sa 2-fenyletanol zvyčajne získava extrakciou z rastlín a kvetov, konkrétne okvetných lístkov. Avšak koncentrácia v ružiciach je veľmi malá a proces je komplikovaný ťažkými extrakčnými protokolmi, čo spôsobuje, že je veľmi nákladný [19].

2.3.2 Výskum rodu *Metschnikowia*

V súčasnosti kvôli vplyvu na kvalitu a profil vína patria kvasinky rodu *Metschnikowia* medzi najviac študované kvasinky. Kvasinky rodu *Metschnikowia* môžeme rozdeliť na dve skupiny v závislosti na obývanom biotope. Prvú skupinu tvoria kvasinky obývajúce vodný biotop a druhú skupinu tvoria kvasinky obývajúce suchozemský biotop. Druhá skupina kvasiniek je asociovaná s rastlinami [10]

Vedcom sa podarilo vytvoriť pomocou čiastočnej sekvencie 26S rRNA a neighbor-joining analýzy fylogenetický strom niektorých druhov *Metschnikowia* (Obrázok 5) [21].

Výskumom bola dokázaná produkcia významných produktov hlavne pigmentu pulcherrimín a silná antagonistická aktivita kmeňov *Metschnikowia pulcherima* na ľudských patogénoch *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* a *Trichosporon mucoides*. Štúdie tiež ukázali antagonistické účinky na rast húb druhu *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* a na ďalších druhoch v rôznych rozsahoch [22].



Obrázok 5: Fylogenetický strom niektorých druhov *Metschnikowia* [21].

2.4 Odpadné substráty z potravinárskych výrob

V dnešnej dobe sú odpady potravinárskeho priemyslu dostupné vo veľkom množstve po celom svete. Väčšina týchto odpadov obsahuje lignín, celulózu a hemicelulózu. Biologické spôsoby využívania odpadov sa týkajú hlavne tých odpadov, ktorých podstatu tvoria biologicky rozložiteľné látky (bioodpady). Medzi odpadné substráty patria zemiakové šupy, ryžová slama, ryžové otruby, pšeničná slama, kukuričné otruby, odpad zo spracovania ovocia, odpad po vylisovaní semien olejnatých rastlín (repka olejná, sója, slnečnica), hľuznaté rastliny obsahujúce škrob (zemiaky), odpadné vody z potravinárskeho priemyslu a oveľa viac. Vo väčšine prípadov sú významným zdrojom organických látok a minerálnych živín [23].

Významný podiel týchto odpadov tvoria hlavne polysacharidy, napr. celulóza, ktorá je rýchlo rozložiteľná mikroorganizmami. Mikroorganizmy sú schopné využívať organické látky ako zdroj energie pre rast a uhlík pre syntézu bunecnej biomasy. Odpadné substráty z potravinárskej výroby sa často používajú pri alternatívnom spôsobe produkcie lipidov

prostredníctvom oleogénnych kvasiniek. Pre svoje zloženie sú využité ako ekonomický výhodnejší zdroj uhlíka. Veľké množstvo rastlinnej biomasy považovanej za odpad môže byť využitá ako biopalivo, chemikálie, lacné energetické zdroje pre fermentáciu alebo pri výrobe doplnkov pre ľudskú spotrebu [24, 25].

2.4.1 Slama

Je niekoľko druhov slamy, napr. pšeničná, žitná, ryžová a ďalšie. Pšeničná slama (*Triticum aestivum*) je lignocelulózový materiál obsahujúci 35 - 40 % celulózy, 30 - 35 % hemicelulózy a 8 - 15 % lignínu. Využíva sa ako lacný produkt pre produkciu paliva a výrobu etanolu. Využitie hemicelulózových a celulóзовých cukrov prítomných v lignocelulózovom materiálu je potrebné pre výrobu etanolu. Cukry sú úspešne premenené na etanol baktériami a kvasinkami. Slama sa tiež dá použiť ako cenný zdroj uhlíka pri kultivácii kvasiniek, je to cesta k energeticky efektívnej výrobe širokej škály komerčne cenných chemických výrobkov [26, 27].

2.5 Lipidy

V posledných rokoch sa biotechnologický priemysel čoraz viac zameriava na mikrobiálnu produkciu lipidov za využitia odpadných zdrojov z prírodných látok a oleogénnych mikroorganizmov. Takýmto spôsobom vyprodukované lipidy označujeme ako „single-cell oils“, sú zložené hlavne z triacylglycerolov a v malej miere zo stearylesterov. Je veľký záujem o veľkokapacitnú výrobu single-cell oils (SCO) kvôli odlišnému zloženiu lipidov, oproti lipidom z človeka a sŕcov, kde sú medicínsky a dieteticky dôležité polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA). Medzi ne zaradíme napr. kyselinu linolovú, linolénovú a arachidonovú [6, 28, 29].

V dnešnej dobe s rozvojom ekologického myslenia a príslušných právnych predpisov v celom svete vznikol obrovský trh, ktorý využíva lipidy v automobilovom priemysle. S príchodom bionafty stúpla cena rastlinných surovín obsahujúcich lipidy a s nimi spojené ceny potravín. Táto situácia viedla k snahe obnoviť a zaviesť nové nekonvenčné zdroje lipidov, ktoré by sa využili pri výrobe bionafty. Jedna z variant je využitie oleogénnych mikroorganizmov a odpadných substrátov z potravinárskeho a poľnohospodárskeho priemyslu. Potenciál využitia oleogénnych mikroorganizmov spočíva v schopnosti produkovať veľké množstvo lipidov na množstvo vyprodukovanej biomasy a ešte pomerne veľkým zastúpením polynenasýtenými mastnými kyselinami. Ďalej na schopnosti mikroorganizmov utilizovať ako zdroj energie rôzne druhy odpadných substrátov [30].

2.5.1 Štruktúra lipidov

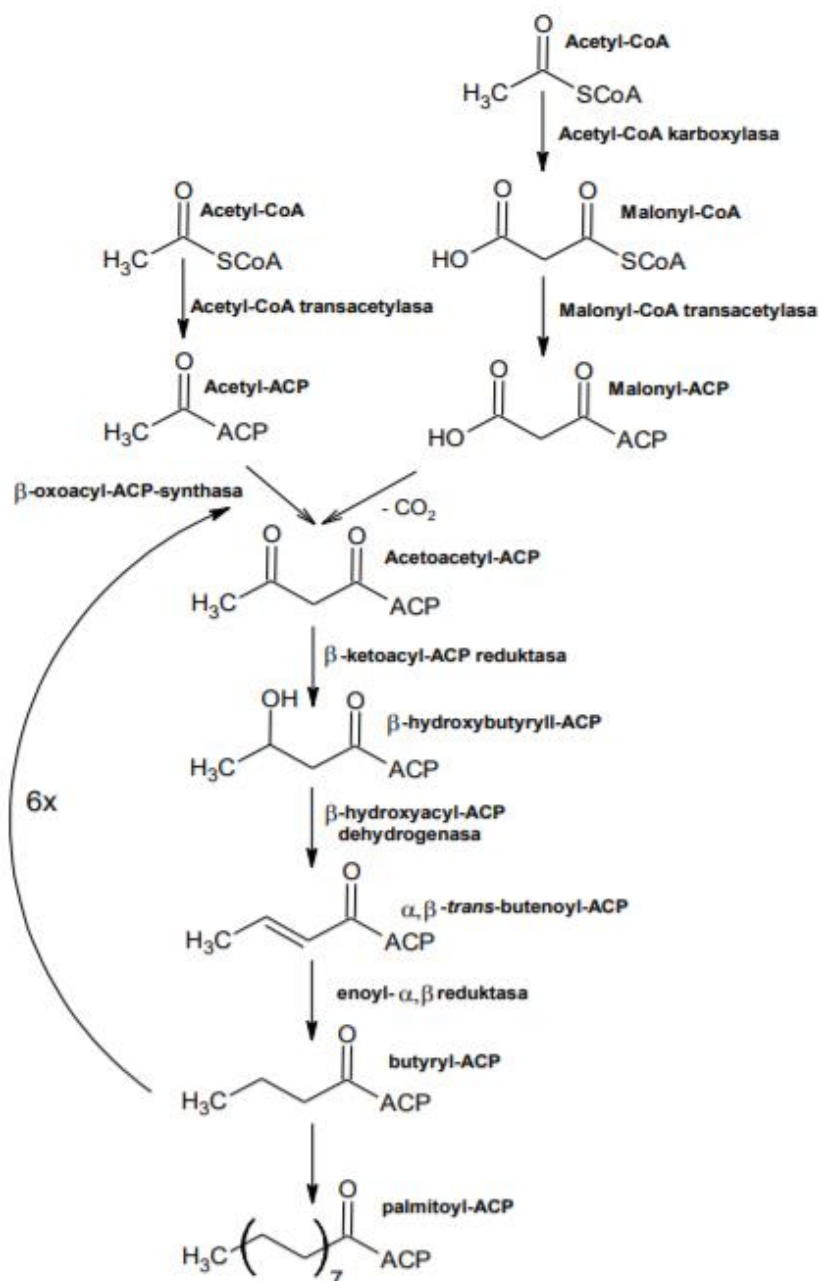
Z chemického hľadiska ide o estery alkoholov a vyšších mastných kyselín. Lipidy sa rozdeľujú na dve základné skupiny jednoduché a zložené lipidy [6, 28].

- a) Jednoduché lipidy – rozdeľujú sa na vosky (estery vyšších mastných kyselín a vyšších alkoholov) a acylglyceroly (oleje a tuky) [6, 28].

- b) Zložené lipidy – štruktúrou ide o acylglyceroly, na ktorých je jedna z esterových väzieb esterifikovaná inou kyselinou (napr. fosforečnou). Obsahujú ďalšie viazané zložky ako sacharidy a rôzne alkoholy, vďaka ktorým získavajú amfipatický charakter. Patria sem napríklad glykolipidy alebo fosfolipidy [6, 28].

2.5.2 Biosyntéza mastných kyselín

Východiskovým intermediátom pri syntéze mastných kyselín je acetyl-CoA. Pomocou enzýmu acetyl-CoA-transacetylázy je prvá molekula acetyl-CoA prevedená na acetyl-ACP a následne naviazaná na cysteínový zbytok enzymatického komplexu syntézy mastných kyselín (FAS) za uvoľnenia ACP. Druhá molekula acetyl-CoA je predĺžená o jeden uhlík pôsobením acetyl-CoA karboxylázy za vzniku malonyl-CoA, a potom prevedený na malonyl-ACP. Pomocou konjugačného enzýmu je takto vzniknutý malonyl-ACP prevedený na FAS komplex obsahujúci acetylový zbytok. Pôsobením β -oxoacyl-ACPsyntázy a následnou kondenzáciou spojenou s dekarboxyláciou vzniká acetoacetyl-ACP. Ďalej na FAS komplexe je vzniknutý acetoacetyl-ACP spracovávaný radou enzymatických reakcií zahrňujúcich redukciu oxo-skupiny β -ketoacyl-ACP-reduktázou na β -hydroxybutyrylACP. Nasledujúcou dehydratáciou katalyzovanou β -hydroxyacyl-dehydrogenázou vzniká α,β -trans-butenoyl-ACP. Posledným krokom je druhá redukcia enoyl- α,β -reduktázou za vzniku konečného butyryl-ACP. Týmto postupom sa 2 uhlíkového reťazca acetyl-CoA predĺži o dva uhlíky. Tento mechanizmus je 16-krát opakovaný za vzniku 16 uhlíkového reťazca kyseliny palmitovej (palmitoyl-ACP). Následnými enzymatickými reakciami špecifickými pre jednotlivé organizmy je palmitová kyselina transformovaná na iný druh mastnej kyseliny (Obrázok 6) [28].



Obrázok 6: Schéma biosyntézy acylglycerolu [28].

2.5.3 Produkcia lipidov kvasinkami

Niekoľko rôznych druhov kvasiniek bolo zaradených medzi oleogénne mikroorganizmy, pretože pri vhodných podmienkach sú schopné tvoriť triacylglyceroly. Bolo dokázané, že k akumulácii lipidov v oleogénnych plesniach a kvasinkách je jeden z nutrientov limitujúcich v médiu a zdroj uhlíku je prítomný v nadbytku. Limitácia dusíka v médiu je najefektívnejší faktor na stimuláciu tvorby lipidov. Dusík je počas fázy rastu potrebný na syntézu nukleových kyselín a proteínov. Spotreba uhlíka sa rozdeľuje medzi dva pochody: anabolické a energetické, využívajúc lipidy, proteíny, nukleové kyseliny a sacharidy. Pri limitácii dusíku dochádza k znižovaniu rýchlosti rastu a k zastaveniu syntézy proteínov a nukleových kyselín [31].

Pri ostatných druhoch mikroorganizmov ostáva nevyužitý prebytok uhlíku alebo je prevedený na zásobné polysacharidy, pričom u oleogénnych druhoch dochádza v intracelulárnych lipidových organelách k akumulácii triacylglycerolov [31].

2.5.4 Produkcia lipidov prostredníctvom rodu *Metschnikowia* za využitia odpadných substrátov

V posledných rokoch bolo preukázané pri rôznych štúdiách, že použitím rôznych kultivačných substrátov je možné dosiahnuť zvýšenej produkcie lipidov u kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*. Táto kvasinka bola definovaná ako oleogénna kvasinka, čo znamená že je schopná produkovať lipidy. Produkcia lipidov v oleogénnych kvasinkách nastáva, keď je živina v médiu obmedzená a zdroj uhlíka je prítomný v nadbytku. Kultivácia kvasiniek nevyžaduje svetlo, čo znižuje vstupné náklady a umožňuje nepretržitú výrobu. *Metschnikowia pulcherrima* je schopná znášať obzvlášť stresujúce stavy, ako je kyslé prostredie v dôsledku vysokých hladín kyseliny vínnej a jablčnej a vysokého osmotického tlaku kvôli vysokému obsahu cukru v ovocí a rastlinách, z ktorých býva izolovaná. Nedávne štúdie ukázali jej schopnosť produkovať širokú škálu enzýmov, čo dokazuje metabolickú plasticitu a možné široké využitie v priemysle [32, 33, 34, 35, 36].

Rod *Metschnikowia* preukázal v štúdiách, že je schopný utilizovať rozličné zdroje uhlíka. Má tiež vysokú flexibilitu pri kultivácii s rôznymi typmi zdrojov. Pri jednotlivých štúdiách boli pri kultivácii použité ako zdroj uhlíka rôzne odpadné substráty. Ako zdroj uhlíka býva pri kultiváciách často použitý surový glycerol. Pri použití glycerolu, bola dosiahnutá nízka produkcia biomasy. Percentuálne zastúpenie lipidov v biomase pri rode *Metschnikowia* bola v priemere 5,54 % . Pre zlepšenie výnosnosti kultivácie je potrebné dodržať 2 kroky. Ako prvý krok, kultivácia musí prebiehať pri vhodných podmienkach, ktoré podporujú produkciu vegetatívnych buniek. Druhým krokom je pripraviť vhodné podmienky na inhibíciu sporulácie. Pre prvý krok je výhodné pH 4 až 4,5 a teplota 20 až 25 °C. Pri druhom kroku je potrebné znížiť teplotu pod 20 °C a pH 2 až 4. Pre kultiváciu kvasinky je tiež dôležité poskytnúť aspoň jeden zdroj uhlíka a aspoň jeden zdroj dusíka alebo síry. Síru alebo dusík je výhodné poskytnúť len v obmedzenom množstve. Výhodné je poskytnúť aspoň jeden zdroj dusíka v koncentrácií približne 0,2g/l alebo síry v koncentrácií 0,04 g/l. Pre kultiváciu je vhodné množstvo dostupného uhlíka 12g/l alebo vyššie. Pomer uhlíku k dusíku môže byť 60:1 a pomer uhlíka k síre 300:1. Pri dodržaní daných podmienok sa môže dosiahnuť produkcia lipidov v množstve približne 40 % celkovej suchej hmotnosti [33, 36].

Rod *Metschnikowia* je schopný utilizovať uhlík aj z morských rias. Pred kultiváciou je potrebné pripraviť rastové médium, ktoré obsahuje rad monosacharidov a polysacharidov, ako aj makronutrientov a mikronutrientov, aby mohli byť metabolizované oleogénnymi kvasinkami rodu *Metschnikowia*. Najväčší potenciál majú hnedé riasy *Saccharina latissima*. Pri výskume bolo dosiahnuté 37,2 % zastúpenie lipidov [37].

Kvasinka je schopná produkcie lipidov aj na odpadných substrátoch z potravinárskej výroby. Odpady z potravinárskej výroby boli pri štúdií podrobené hydrolýze. Fermentácie za využitia odpadných substrátov z potravinárskej výroby boli prevedené v 5 litrovom bioreaktore a po 96 hodinách kultivácie bol získaný výtťažok biomasy 12,8 g / l. Percentuálne zastúpenie lipidov v biomase bolo stanovené na 21,1% . Boli prevedené štúdie aj za využitia

pšeničnej slamy ako náhradného zdroja uhlíka, ktorý by mohol znížiť cenu kultivácie. A tiež, aby vyprodukované mikrobiálne lipidy boli v budúcnosti konkurenciaschopné s rastlinnými olejmi. Kvasinky sú schopné produkovať až 40 % obsahu oleja na biomasu prostredníctvom katabolizmu širokého spektra oligosacharidov a monosacharidov. Kvasinky môžu byť kultivované v nesterilných podmienkach v dôsledku kombinácie kultivácie pri nízkom pH a produkcie antimikrobiálnych látok [25, 33, 34, 38].

Vyprodukované lipidy z odpadných substrátov by sa mohli použiť ako účinná surovina na výrobu bionafty alebo náhrady palmového oleja. Analýza lipidov vyprodukovaných rôznymi kmeňmi rodu *Metshcnikowia* poukázala na majoritné zastúpenie kyseliny olejovej, palmitovej, palmitoolejovej a ďalších. Prítomnosť polynenasýtených mastných kyselín poskytuje možnosť aplikácie kvasinky rodu *Mestchnikowia* v rôznych druhoch priemyslu napr. farmaceutickom a potravinárskom [25, 33, 34].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie, prístroje a pomôcky

3.1.1 Použité chemikálie:

3.1.1.1 Chemikálie použité na kultivačné médium

Bakteriologický agar, Himedia (India)
Chlorid sodný p.a., Lachema (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lachema (ČR)
D-glukóza monohdrát p.a., Penta (ČR)
Hydrogenfosforečnan didraselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Hydrogenfosforečnan disodný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Kvasničný autolyzát, Himedia (India)
Síran horečnatý heptahdrát p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Pepton aus Casein, Roth (SRN)

3.1.1.2 Chemikálie použité pri stanovení sacharidov

Glukosa, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Fenol, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Ethanol, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Kyselina sírová 96%, p.a., Penta (ČR)
Hydrogenuhlíčitán sodný, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Vínan sodno-draselný, Lachema (ČR)
Síran sodno-draselný, Lachema (ČR)
Síran sodný, Lach-Ner s.r.o. (ČR)

3.1.1.3 Chemikálie použité na prípravu vzoriek pre GC

Hexan pre HPLC, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Metanol p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Metanol pre HPLC, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
Kyselina sírová 96%, p.a., Penta (ČR)
Kyselina heptadekánová, Sigma – Aldrich (SRN)
Hydroxid sodný, Lach-Ner s.r.o. (ČR)

3.1.2 Prístroje a pomôcky:

3.1.2.1 Pomôcky pre kultiváciu

Analytické váhy Boeco (SRN)
Centrifúga U-32R, Boeco (SRN)
Centrifúga Z36HK, Hermle Labortechnik GmbH, (SRN)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
GKB Color Digital CCD kamera (Taiwan)
Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s.r.o. (ČR)

Laminárny box Aura mini (IT)
Trepáčka IKA Yellow Line (SRN)
Chladiaci box, Guzzanti GZ19 (ČR)
Ultrazvuk, PS0200, Powesonic s.r.o. (SK)

3.1.2.2 Pomôcky pre izoláciu a analýzu lipidov

Vortex-Genie 2, Scientific Industries (USA)
Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)
Sklenené guľôčky, Roth (DE)
Termoblok, SBH200D, Stuart (UK)
Plynový chromatograf TRACE GC ThermoQuest Italia S. p. A (IT)
FID detektor
kapilárna kolóna DB-WAX o rozmeroch 30 m x 0,32 mm x 0,5 µm

3.1.3 Kvasinkové kmene:

Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-145
Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-147
Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-149
Metschnikowia andauensis CCY 029-002-129
Metschnikowia fructicola CCY 029-002-15
Kvasinkové kmene použité v práci boli získané zo zbierky kultúr kvasiniek (Culture collection of yeasts, CCY), Bratislava

3.2 Kultivácia kvasiniek rodu *Metschnikowia*

3.2.1 Kultivačné médium:

Pre optimálnu kultiváciu kvasiniek bolo použité tekuté kultivačné médium, ktorého zloženie je uvedené (Tabuľka 1). Kvasinky boli kultivované v Erlenmayerových bankách pri podmienkach stáleho trepania z dôvodu aerácie. Média boli sterilované pomocou tlakového hrnca s otvoreným ventilom, vždy po dobu 25 minút pri 120 °C.

Tabuľka 1: Zloženie kultivačného média na 1 liter destilovanej vody

Chemická zložka	Množstvo [g]
glukóza	20
kvasničný extrakt	10
bakteriologický peptón	5
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	0,2
MgSO ₄	0,5
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,1

3.3 Rastová krivka

Rastová krivka vyjadruje časovú závislosť nárastu biomasy kvasinky. Rastová krivka bola stanovená pre všetky kmene rovnakým spôsobom. Meraná bola v produkčnom médiu, z ktorého sa asepticky odobralo 11 ml frakcie 2-krát za deň pre laboratórnu teplotu po dobu dvoch týždňov a pre zníženú teplotu bola prvé 3 dni tiež odoberaná frakcia 2-krát za deň, a potom už iba raz denne. Z frakcie sa odobralo 1 ml na stanovenie zákalu a 10 ml bolo použité na stanovenie biomasy.

3.3.1 Príprava kultivačných médií

3.3.1.1 Inokulum č. 1

Objem 50 ml sterilného média (Tab. 1) v Erlenmeyerovej banke s objemom 250 ml bol zaočkovaný tromi očkovacími klíčkami zásobnej kultúry vybraného kmeňa *Metschnikowia* z agarovej platne. Kultivácia prvého inokula prebiehala pri podmienkach stáleho trepania (120 rpm) a laboratórnej teplote po dobu 24 hodín. Inokulum č. 1 bolo použité pre zaočkovanie produkčného média č. 1.

3.3.1.2 Inokulum č. 2

Bolo pripravené 50 ml kultivačného média v Erlenmeyerovej banke s objemom 250 ml bol zaočkovaný tromi očkovacími klíčkami vybraného kmeňa *Metschnikowia* z agarovej platne.

Kultivácia druhého inokula prebiehala pri podmienkach stáleho trepania (120 rpm) pri laboratórnej teplote po dobu 24 hodín. Inokulum č. 2 bolo použité pre zaočkovanie produkčných médií č. 2.

3.3.1.3 Produkčné médium č. 1

Do Erlenmeyerovej banky s objemom 1000 ml bolo prevedené inokulum č. 1 tak, aby pomer inokulum:produkčné médium bolo 1:5. Kultivácia prebiehala pri podmienkach stáleho trepania (120 rpm) a laboratórnej teplote 20 °C po dobu 192 hodín. Počas tejto doby boli prevádzané 2-krát denne odbery a bolo sledované množstvo biomasy turbidimetricky a množstvo sušiny gravimetricky. Pri meraní absorbancií bola vzorka riedená a kontaminácia bola sledovaná pod mikroskopom.

3.3.1.4 Produkčné médium č. 2

Kultivácia prebiehala paralelne v deviatich Erlenmeyerových bankách (100 ml) s obsahom 25 ml produkčného média, z ktorých každá obsahovala 5 ml inokula č. 2 pri podmienkach stáleho trepania (120 rpm). Prvé 3 dni boli bunky kultivované pri laboratórnej teplote a následne pri teplote 15 °C v inkubátore. Prvé 3 dni boli odbery 2-krát denne a potom už len raz denne po dobu hodín. Bolo sledované množstvo biomasy turbidimetricky a množstvo sušiny gravimetricky. Pri meraní absorbancií bola vzorka riedená a kontaminácia bola sledovaná pod mikroskopom.

3.3.2 Stanovenie množstva biomasy turbidimetricky

Objem 1 ml vzorky kvasinkovej suspenzie bol 10-násobne zriedený. Absorbancia zriedeného roztoku bola premeraná pri vlnovej dĺžke 630 nm proti destilovanej vode.

3.3.3 Gravimetrické stanovenie množstva biomasy

Objem 10 ml vzorky kvasinkovej suspenzie bol scentrifugovaný v centrifúge 5 minút na 4500 rpm pri teplote 20 °C. Následne bol sediment z kvasinkovej suspenzie zriedený 1 ml destilovanej vody premiešaný a znova bol scentrifugovaný 5 minút na 4500 rpm pri teplote 20 °C. Sediment z kvasinkovej suspenzie bol zriedený z 1 ml destilovanej vody premiešaný a bol kvantitatívne prevedený na vopred predváženú misku. Miska s kvasinkovou suspenziou bola pri 60 °C vysušená a po vysušení bola zvážená.

3.4 Analytické a separačné metódy

3.4.1 Charakterizácia biologického materiálu

Pre experimentálnu časť boli vybrané 3 rôzne odpadné potravinárske produkty: zemiakové šupky, pšeničná slama a kukuričné šúpolie.

3.4.2 Príprava vzorku

Všetky pevné vzorky boli pred stanovením spracované nasledujúcim spôsobom. Vzorka zemiakových šupiek bola najprv nakrájaná na malé kúsky a vysušená pri 60 °C po dobu

24 hod. Vzorky kukuričného šúpolia a vysušenej pšeničnej slamy sa najprv postrihali na 3 cm kúsky a pomleli. Následne boli vzorky zvážené na analytických váhach s presnosťou na 4 desatinné miesta. Pre stanovenie bolo použité 0,5 g na 10 ml extrakčného činidla. Navážky boli rozotrené pomocou tlčika v trecej miske s malým množstvom extrakčného činidla a kvantitatívne prevedené do centrifugačnej skúmavky.

3.4.3 Extrakcia sacharidov

3.4.3.1 Postup extrakcie

Všetky pripravené vzorky boli extrahované 2 extrakčnými činidlami. Ako extrakčné činidlo bola použitá voda a 80 % etanol. Vzorky boli extrahované po dobu 3 hodín pri laboratórnej teplote za neustáleho trepania na trepačke. Po ukončení extrakcie boli vzorky prefiltrované cez filtračný papier a následne bolo 10 ml filtrátu vyčírené Carrezovými roztokmi I. a II. Po pridaní 0,5 ml Carrezového roztoku I bolo za stáleho miešania pridaný 0,5 ml Carrezový roztok II. Vyčírený extrakt bol scentrifugovaný na centrifúge. Extrakty boli použité na stanovenie celkových sacharidov podľa Duboise a stanovenie redukujúcich sacharidov podľa Somogyi-Nelsona.

3.4.4 Stanovenie celkových sacharidov podľa Duboise

Celkové sacharidy boli stanovené spektrofotometricky podľa Duboise. Pre kalibráciu bol pripravený základný vodný roztok glukózy o koncentracii 100 $\mu\text{g/ml}$ a z neho bolo pipetované 0; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 ml a doplnilo sa do celkového objemu 1 ml extrakčným činidlom. K vlastnému stanoveniu sa pipetovalo 1 ml vzorky. K 1 ml všetkých vzorkov a všetkých štandardov bol pridaný 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Zmes bola pretrepaná a ponechaná pri laboratórnej teplote po dobu 1 hodiny. Absorbancia bola zmeraná spektrofotometricky pri 490 nm proti slepému vzorku.

3.4.5 Stanovenie redukujúcich sacharidov podľa Somogyi-Nelsona

Redukujúce sacharidy sa stanovili spektrofotometricky podľa Somogyi-Nelsona. Najprv boli pripravené 3 činidlá: Somogyiho činidlo I (24 g bezvodého Na_2CO_3 , 16 g NaHCO_3 , 14 g vinanu sodno-draselného a 12 g síranu sodno-draselného a všetko rozpustíme v 800 ml destilovanej vody), Somogyiho činidlo II (4 g síranu meďnatého a 24 g síranu sodného sa rozpustilo vo 200 ml destilovanej vody), Somogyi-Nelsonovo činidlo III (25 g molybdénanu amonného sa rozpustilo v 450 ml destilovanej vody, následne sa pridalo 21 ml koncentrovanej kyseliny sírovej a 25 ml roztoku obsahujúceho 3 g arzenínanu sodného, roztok sa ponechal 48 hodín odstáť pri laboratórnej teplote v tme).

Pre kalibráciu bol pripravený základný roztok glukózy o koncentracii 200 $\mu\text{g/ml}$ a z neho bolo pipetované 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 ml do pripravených skúmaviek. K stanoveniu sa následne odpipetovalo 1 ml roztoku glukózy a 1 ml zmesi Somogyiho činidla I a II. Roztok bol povarený 15 minút vo vriacom vodnom kúpeli a ochladený studenou vodou. K ochladenému roztoku boli pridané 0,5 ml Somogyiho činidla III. Skúmavka bola intenzívne premiešaná na vortexe a doplnená destilovanou vodou na 10 ml a bola premeraná ich absorbancia pri 720 nm proti slepému vzorku. Slepá vzorka obsahovala destilovanú vodu a všetky 3 činidlá podľa postupu.

K vlastnému stanoveniu sa pipetoval 1 ml roztok vzorku a 1 ml Somogyiho činidla I a II. Zmes bola povarená 15 minút vo vriacom vodnom kúpeli a ochladená studenou vodou. K ochladenému roztoku boli pridané 0,5 ml Somogyi-Nelsonovho činidla III. Vzorky boli intenzívne premiešané a doplnené destilovanou vodou na 10 ml a bola premeraná ich absorbanca pri 720 nm proti slepému vzorku.

3.5 Produkcia lipidov prostredníctvom rodu *Metschnikowia* za využitia odpadných substrátov

Kultivácia prebiehala v tekutom produkčnom médiu. Pre každý kmeň bolo pripravené inokulum. Pre každé inokulum bolo pripravené produkčné médium tak, aby pomer inokulum a produkčné médium bolo 1:5. Zloženie produkčného média je uvedené v (Tabuľka 1). Inokulum bolo zaočkované tromi očkovacími kľúčkami vybraných kmeňov *Metschnikowia* z agarovej platne. Inokulum bolo kultivované po dobu 24 hodín za neustáleho trepania. V každej kultivácii bolo pre každý kvasinkový kmeň pripravené vlastné inokulum podľa postupu. Do 60 ml produkčného média bolo asepticky naočkované 10 ml inokula. Následne bol v produkčnom médiu menený pomer glukózy a odpadných substrátov. Pri prvej kultivácii bol pomer glukózy k odpadným substrátom 1:1 (Tabuľka 2) a pri druhej kultivácii boli použité výhradne len odpadné substráty ako zdroj uhlíka (Tabuľka 3). Množstvo odpadného substrátu bolo prepočítané tak, aby obsah sacharidov v odpade korešpondoval množstvu glukózy v optimálnom médiu.

Tabuľka 2: Zloženie produkčného média na 1 liter destilovanej vody s využitím odpadných substrátov s glukózou v pomere 1 : 1

Odpadný substrát	Zemiakové šupky		Kukuričné šúpolie		Pšeničná slama	
	chemická zložka	množstvo [g]	chemická zložka	množstvo [g]	chemická zložka	množstvo [g]
	zemiakové šupky	23	kukuričné šúpolie	62	pšeničná slama	70
	glukóza	10	glukóza	10	glukóza	10
	kvasničný extrakt	10	kvasničný extrakt	10	kvasničný extrakt	10
	bakteriologický peptón	5	bakteriologický peptón	5	bakteriologický peptón	5
	KH ₂ PO ₄	1	KH ₂ PO ₄	1	KH ₂ PO ₄	1
	K ₂ HPO ₄	0,2	K ₂ HPO ₄	0,2	K ₂ HPO ₄	0,2
	MgSO ₄	0,5	MgSO ₄	0,5	MgSO ₄	0,5
	NaCl	0,1	NaCl	0,1	NaCl	0,1
	CaCl ₂	0,1	CaCl ₂	0,1	CaCl ₂	0,1

Tabuľka 3: Zloženie produkčného média na 1 liter destilovanej vody s využitím odpadných substrátov

Odpadný substrát	Zemiakové šupky		Kukuričné šúpolie		Pšeničná slama	
	chemická zložka	množstvo [g]	chemická zložka	množstvo [g]	chemická zložka	množstvo [g]
	zemiakové šupky	46	kukuričné šúpolie	124	pšeničná slama	140
	kvasničný extrakt	10	kvasničný extrakt	10	kvasničný extrakt	10
	bakteriologický peptón	5	bakteriologický peptón	5	bakteriologický peptón	5
	KH ₂ PO ₄	1	KH ₂ PO ₄	1	KH ₂ PO ₄	1
	K ₂ HPO ₄	0,2	K ₂ HPO ₄	0,2	K ₂ HPO ₄	0,2
	MgSO ₄	0,5	MgSO ₄	0,5	MgSO ₄	0,5
	NaCl	0,1	NaCl	0,1	NaCl	0,1
	CaCl ₂	0,1	CaCl ₂	0,1	CaCl ₂	0,1

3.5.1 Spracovanie a stanovenie množstva biomasy spektrofotometricky

Bol odobratý 1 ml vzorky. Vzorka bola nariadená destilovanou vodou 20-násobne, aby bol dodržaný rozsah spektrofotometra. Následne bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 630 nm, kde ako blank bolo použité produkčné médium s odpadným substrátom. Stanovené hodnoty absorbancie boli následne použité pre výpočet sušiny pomocou stanovených rastových kriviek pre jednotlivé kmene.

3.5.2 Gravimetrické stanovenie biomasy pre plynovú chromatografiu

Bolo odobratých 10 ml vzorky, ktorá bola scentrifugovaná pri 5000 otáčkach po dobu 5 minút. Potom bol supernatant zliaty a vzorka bola zriedená 1 ml fyziologického roztoku a prenesená do eppendorfiiek. Pred stanovením sa nechali vzorky v eppendorfkách 1 deň lyofilizovať. Po lyofilizácii sa zvážením stanovilo množstvo biomasy.

3.5.3 Transesterifikácia lipidov

Do krymplovacej skúmavky bolo navážených 10 mg biomasy a 1,9 ml transesterifikačnej zmesi. Transesterifikačná zmes obsahovala 15 % H₂SO₄ v metanole pre HPLC a 0,5 mg/ml kyseliny heptadekánovej (interný štandard). Takto pripravené skúmavky sa zakrympovali a inkubovali v termobloku pri 90°C po dobu 3 hodiny. Po prebehnutí transesterifikácie a vychladnutí vzorky sa k jej obsahu pridalo 0,5 ml 0,05 M NaOH a 0,9 ml hexanu pre HPLC táto zmes bola intenzívne pretrepaná. Po dokonalom oddelení fáz bolo odobratých 0,1 ml

z vrchnej fáze a prevedených do vialky určenej na GC analýzu. Vialka sa doplnila pridaním 0,9 ml hexanu pre HPLC a vzorka bola analyzovaná prostredníctvom plynovej chromatografie.

3.5.4 Analýza lipidov

Na analýzu získaných transesterifikovaných lipidov bol použitý plynový chromatograf TRACE GC s automatickým dávkovačom. Detekcia vzoriek prebehla plameňovo ionizačným detektorom. Dáta boli vyhodnotené v programe TRACE a MS Excel. Mastné kyseliny vo vzorkách boli identifikované na základe známych retenčných časov štandardov jednotlivých mastných kyselín a na základe plochy píku bolo prevedené kvantitatívne zastúpenie mastných kyselín. Pre stanovenie celkovej hmotností lipidov boli použité látkové množstvá mastných kyselín prevedené na hmotnosť glycerolu a následne na celkový obsah lipidov vo vzorke.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Rastová krivka

Stanovenie rastových charakteristík u využívaných mikroorganizmov je dôležité pre pochopenie fyziológie skúmaných kmeňov kvasiniek a pre analýzu produkcie vybraných metabolitov.

Počas merania rastovej krivky kvasiniek rodu *Metschnikowia* bol sledovaný nárast biomasy fotometrickým meraním zákalu pri vlnovej dĺžke 630 nm (Tabuľka 5, Graf 1, Graf 2) postupom uvedeným v kapitole 3.3.2. a gravimetrickým stanovením biomasy podľa postupu (3.3.3). Zo získaných hodnot boli zostrojené kalibračné krivky (Tabuľka 4) závislosti absorbancie na sušine.

Tabuľka 4: Kalibračné krivky pre jednotlivé kmene rodu *Metschnikowia*

kmeň	kalibračná krivka	
	laboratórna teplota	znížená teplota
MP 145*	$y = 1,8237x - 3,3605$	$y = 1,2639x + 2,3350$
MP 147	$y = 1,9053x + 4,2601$	$y = 2,0217x + 0,4253$
MP 149	$y = 1,6496x + 4,1209$	$y = 1,2948x + 6,9381$
MA 129	$y = 2,1948x + 1,5707$	$y = 2,0656x + 2,2891$
MF 15*	$y = 2,0363x - 1,4623$	$y = 1,9463x - 1,0684$

* stanovenia boli prevedené v súbežnej diplomovej práci [39]

4.1.1 Závislosť nárastu sušiny na čase

Sušina pre daný čas bola stanovená z nameraných hodnôt absorbancie A_{630} pomocou kalibračných kriviek s hodnotami korelačných koeficientov (Tabuľka 4) a prepočítané na celkový objem média. Tabuľka 5 udáva príslušné hodnoty absorbancie (A_{630}) a množstvo sušiny v danom čase. Graf 1 vyjadruje závislosť nárastu sušiny na čase kultivácie pri laboratórnej teplote a Graf 2 vyjadruje závislosť nárastu sušiny na čase kultivácie pri zníženej teplote.

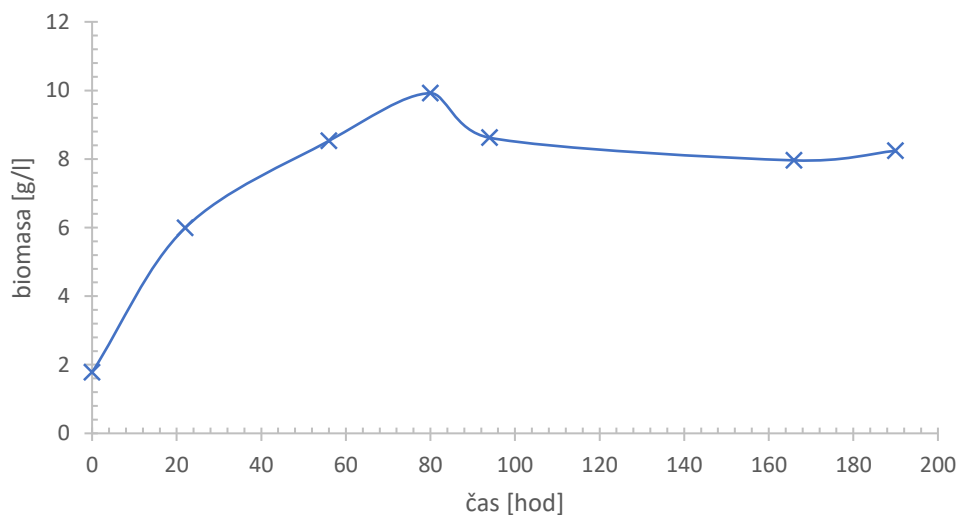
Pri pohľade na rastovú krivku, ktorá bola meraná pri laboratórnej teplote je vidieť, že maximálnemu nárastu biomasy došlo pri 80 hodine kultivácie (Graf 1). Lag fáza rastu kvasiniek prebehla v priebehu kultivácie inokula (3.3.1.1). Na rastovej krivke je možné ako prvú pozorovať fázu zrýchleného rastu, ktorá prechádza do exponenciálnej fázy a prechádza pri 56 hodine do fázy spomaleného rastu. Nasleduje stacionárna fáza, 80 hodina, pri ktorej dosahuje nárast sušiny svoje maximum. Následne po stacionárnej fázy dochádza k postupnému odumieraniu buniek.

Pri rastovej krivke, ktorá bola meraná za zníženej teploty je vidieť, že maximálnemu nárastu biomasy došlo už pri 56 hodine kultivácie (Graf 2). Následne boli bunky prevedené do prostredia zníženej teploty. Museli sa zadaptovať na nové podmienky, rast sa spomaľoval, až prešiel do stacionárnej fázy. Lag fáza rastu kvasiniek tiež prebehla už pri kultivácii inokula (3.3.1.2). Ako prvú fázu na rastovej krivke je možné pozorovať fázu zrýchleného

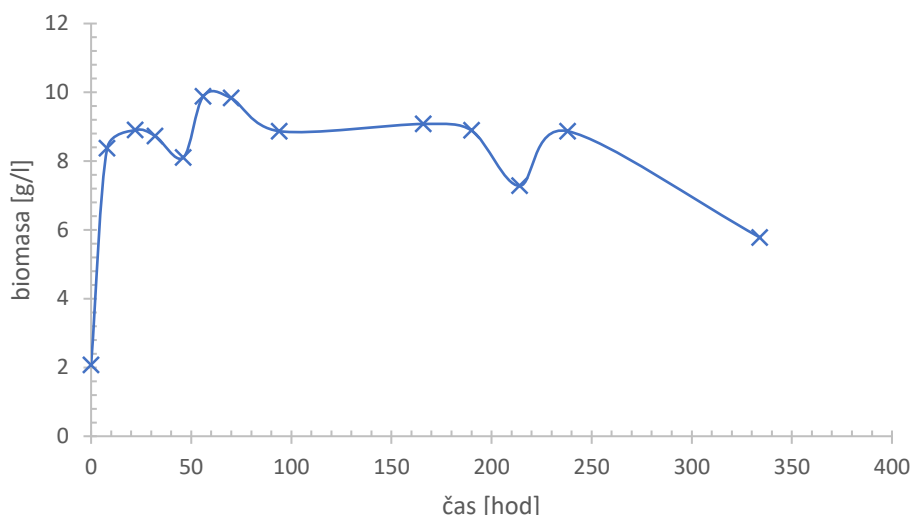
rastu, ktorá plynulo prechádza do exponenciálnej fáze až následne do fáze spomaleného rastu pri 220 hodine. Následne po stacionárnej fáze dochádza k postupnému odumieraniu buniek.

Tabuľka 5: Množstvo sušiny a zodpovedajúci zákal kultúry v danom čase pre kmeň *MP 149*

Pri laboratórnej teplote			Pri zníženej teplote		
čas kultivácie (hod.)	A ₆₃₀ (-)	množstvo sušiny (g/l)	čas kultivácie (hod.)	A ₆₃₀ (-)	množstvo sušiny (g/l)
0	7,26	1,78	0	8,65	2,07
22	12,04	5,99	22	16,6	8,90
56	18,5	8,53	56	19,52	9,88
80	18,8	9,92	70	19,48	9,83
94	18,88	8,62	94	18,90	8,87
166	19,28	7,96	166	19,44	9,08
190	18,28	8,24	190	18,62	8,89
—	—	—	238	18,22	8,87
—	—	—	334	16,46	5,78



Graf 1: Závislosť nárastu biomasy na čase pri laboratórnej teplote *MP 149*



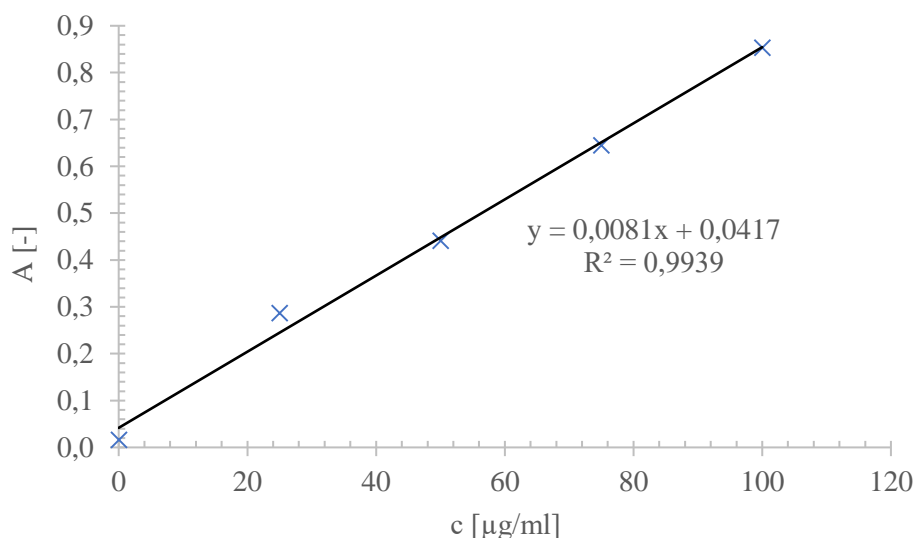
Graf 2: Závislosť nárastu biomasy na čase pri zníženej teplote MP 149

4.2 Extrakcia a analýza odpadných substrátov

Analyzoval sa celkový obsah sacharidov a obsah redukujúcich sacharidov v 3 odpadných substrátoch, ktoré sa ďalej používali pri produkcii lipidov prostredníctvom rodu *Metschnikowia*. Výsledky analýzy boli použité ako podklad pre ich použitie ako zložky kultivačného média pre kultiváciu kvasiniek rodu *Metschnikowia*.

4.2.1 Analýza celkových sacharidov podľa Duboise

Metóda podľa Duboise sa používa často k stanoveniu celkových sacharidov v rôznych druhoch potravinárskych matric, ale tiež aj v mikrobiálnych vzorkách. Spektrofotometricky boli stanovené celkové sacharidy z 3 vzoriek (zemiaky, kukurica a pšenica) podľa postupu v kapitole 3.4.4. Z každej vzorky sa robili 3 paralelné merania v dvoch extrakčných činidlách. Pre každé meranie sa zmerala trikrát absorbancia a výsledná absorbancia sa vypočítala ako priemerná hodnota z nameraných absorbancií. Zastúpenie celkových sacharidov vo vzorkách sa vypočítalo pomocou kalibračnej krivky viz. Graf 3. Návažky príslušných odpadných substrátov sú uvedené v Tabuľka 6.



Graf 3: Kalibračná krivka pre stanovenie celkových sacharidov

Celkové sacharidy boli stanovené podľa Duboise (Tabuľka 7). Stanovené výsledky pre jednotlivé vzorky sa líši od tabelovaných hodnôt, čo môže byť spôsobené tým, že vzorky boli zmesou rôznych odrôd a nebola to len jedna odroda plodiny.

Tabuľka 6: Návažky materiálov pre jednotlivé extrakty v 200 ml extrakčného činidla

odpadný substrát	Extrakcia vodou (g)		
zemiakové šupy	10,0851	10,9101	10,2791
kukuričné šúpolie	9,8312	9,8299	9,891
pšeničná slama	10,0045	10,0042	10,0040

Tabuľka 7: Obsah celkových sacharidov

Vzorka	c (1g /100g) v H ₂ O
zemiakové šupy	83,4 ± 2,5
kukuričné šúpolie	41,1 ± 1,8
pšeničná slama	70,6 ± 0,2

Najvyšší podiel celkových sacharidov bolo stanovené v zemiakových šupkách a najnižší podiel v kukuričnom šúpolí.

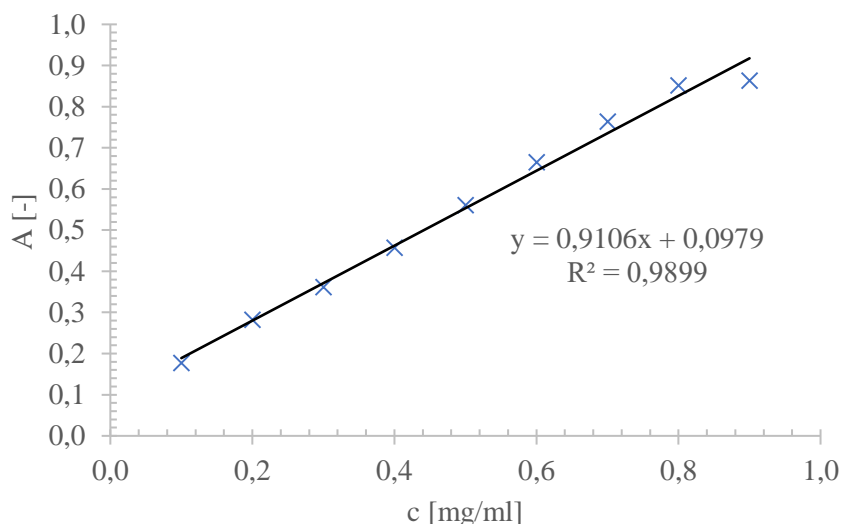
4.2.2 Analýza redukujúcich sacharidov podľa Somogyi-Nelsona

Pomocou Somogyi-Nelson činidiel a následným fotometrickým stanovením boli analyzované extrakty odpadných substrátov. K extrakcií bola použitá voda a 80 % etanol. Jednotlivé extrakty boli vyčírené Carrezovými roztokmi I. a II.

Tabuľka 8: Návažky materiálov pre jednotlivé extrakty v 20 ml extrakčného činidla

odpadný substrát	Extrakcia vodou (g)		
zemiakové šupy	1,0041	1,0420	1,0356
kukuričné šúpolie	0,9966	1,0621	0,9517
pšeničná slama	1,0147	1,0193	1,0690

Obsah redukujúcich sacharidov bol vypočítaný z regresnej rovnice (Graf 4). Stanovené hodnoty redukujúcich sacharidov pre jednotlivé odpadné substráty sú uvedené v (Tabuľka 9).



Graf 4: Kalibračná krivka pre stanovenie redukujúcich sacharidov

Tabuľka 9: Obsah redukujúcich sacharidov

Vzorka	c (1g /100g) v H ₂ O
zemiakové šupy	43,4 ± 1,3
kukuričné šúpolie	16,1 ± 6,3
pšeničná slama	14,2 ± 8,6

Obsah redukujúcich sacharidov vo vodnom extrakte vzorku sa pohyboval od 14,2 g do 43,4 g na 100 g vzorku. Najnižšia hodnota redukujúcich sacharidov bola stanovená u pšeničnej slamy a naopak najvyšší podiel redukujúcich sacharidov obsahovali zemiakové šupky.

4.3 Produkcia lipidov kvasinkami rodu *Metschnikowia*

Na sledovanie produkcie lipidov kvasinkami rodu *Metschnikowia* bolo využitých 5 kmeňov: *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-145, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-147, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-149, *Metschnikowia andauensis* CCY 029-002-129 a *Metschnikowia fructicola* CCY 029-002-15. Schopnosť akumulovať lipidy prostredníctvom týchto 5 kvasinkových kmeňov bola sledovaná v

závislosti na druhu použitého uhlíkového substrátu a jeho koncentrácií. Zloženie použitých kultivačných médií sú uvedené v kapitole 3.5. Prostredníctvom plynovej chromatografie bola sledovaná produkcia lipidov a biomasy.

4.3.1 Vplyv uhlíkového substrátu na produkčné vlastnosti rodu *Metschnikowia*

V závislosti na použitom zdroji uhlíka boli sledované produkčné vlastnosti jednotlivých kmeňov rodu *Metschnikowia*. Bola prevedená kultivácia na médiach s obsahom glukózy alebo odpadného substrátu ako zdroja uhlíka. V prvej sérii kultivácie boli použité média pozostávajúce z glukózy a odpadných substrátov v pomere 1:1. V druhej sérii kultivácie boli použité média, ktoré obsahovali ako zdroj uhlíka len odpadné substráty. Pri kultivácii boli použité 3 druhy odpadných substrátov: zemiakové šupy, kukuričné šúpolie a pšeničná slama.

4.3.2 Produkcia biomasy a lipidov v závislosti na použitom zdroji uhlíka

V závislosti na použitom zdroji uhlíka bola sledovaná produkcia biomasy (g/l) a percentuálne zastúpenie lipidov (%) vzťahnutých na hmotnosť biomasy vo vybraných kmeňoch rodu *Metschnikowia*. Najväčšia produkcia biomasy pri laboratórnej teplote v optimálnom médiu bola u kmeňa *Metschnikowia fructicola*.

4.3.2.1 Produkcia biomasy a lipidov na kultivačných médiách s pomerom glukóza:odpad 1:1

V tabuľke (Tabuľka 10), ktorá zobrazuje kultiváciu vybraných kmeňov kvasiniek na rôznych odpadných substrátov, ale aj v optimálnom médiu je možné pozorovať odchýlky produkcie biomasy v závislosti od využitého kmeňa, tak aj od použitého uhlíkového zdroja.

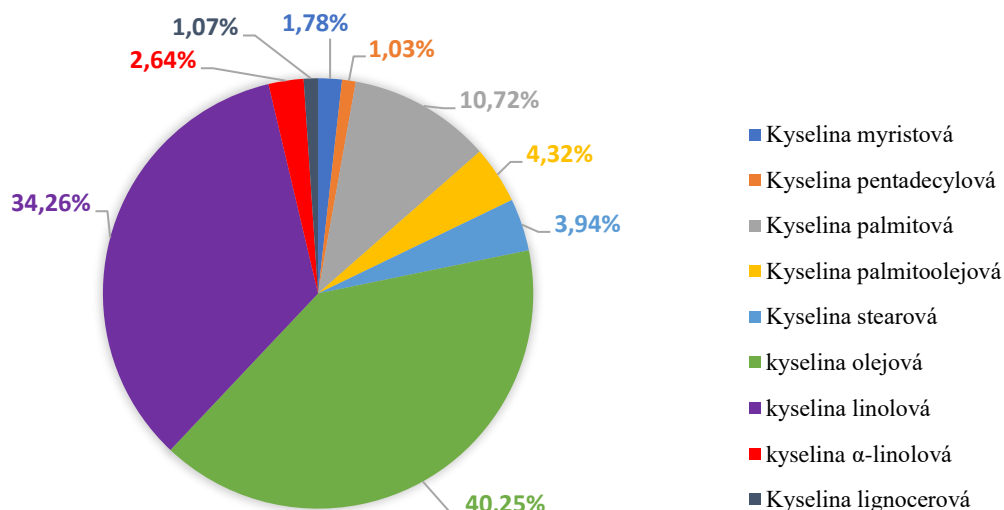
Najväčšia produkcia lipidov bola zaznamenaná pri vzorke MP 149 ZEM a najnižšia produkcia pri vzorke MP 145 KUK. Najvyššia produkcia biomasy bola zaznamenaná na substrátoch, ktoré obsahovali zemiakové šupy. Konkrétne na vzorke MP 149 ZEM., MA 129 ZEM. a MP 145 ZEM., čo môže byť ovplyvnené tým, že obsahovali z daných odpadných substrátov najviac sacharidov.

Tabuľka 10: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov u jednotlivých kvasinkových kmeňoch

Kultivácia s odpadným substrátom v pomere (1:1)		
Kmeň	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)
MP 147 KUK.	4,85	2,43
MP 147 SLAM.	1,95	2,47
MP 147 ZEM.	4,05	2,29
MP 147 OPT.CH.	3,94	4,20
MP 147 OPT.L.B.	6,98	3,31
MP 149 KUK.	5,51	2,25
MP 149 SLAM.	4,17	1,79
MP 149 ZEM.	4,94	4,82
MP 149 OPT.CH.	3,00	2,36
MP 149 OPT.L.B.	5,60	3,00
MF 15 KUK.	2,12	1,45
MF 15 SLAM.	1,68	1,05
MF 15 ZEM.	2,63	0,89
MF 15 OPT.CH.	1,62	1,23
MF 15 OPT. L.B.	7,36	4,33
MA 129 KUK.	5,03	2,59
MA 129 SLAM.	1,92	2,59
MA 129 ZEM.	5,50	2,32
MA 129OPT.CH.	3,60	3,86
MA 129 OPT.L.B.	5,86	3,33
MP 145 KUK.	4,69	0,83
MP 145 SLAM.	1,82	1,36
MP 145 ZEM.	5,03	0,90
MP 145 OPT.CH.	1,20	0,61
MP 145 OPT. L.B.	2,71	2,03

Popri analýze množstva lipidov a biomasy vyprodukovaných kvasinkami rodu *Metschnikowia* bola prevedená aj analýza zastúpenia jednotlivých mastných kyselín. V prvej sérii merania bolo použité pri kultivácii médium obsahujúce ako zdroj uhlíka glukózu a jednotlivé substráty v pomere 1:1. Pri použití jednotlivých odpadných substrátoch sa škála mastných kyselín znateľne nezmenila, zmenilo sa len percentuálne zastúpenie.

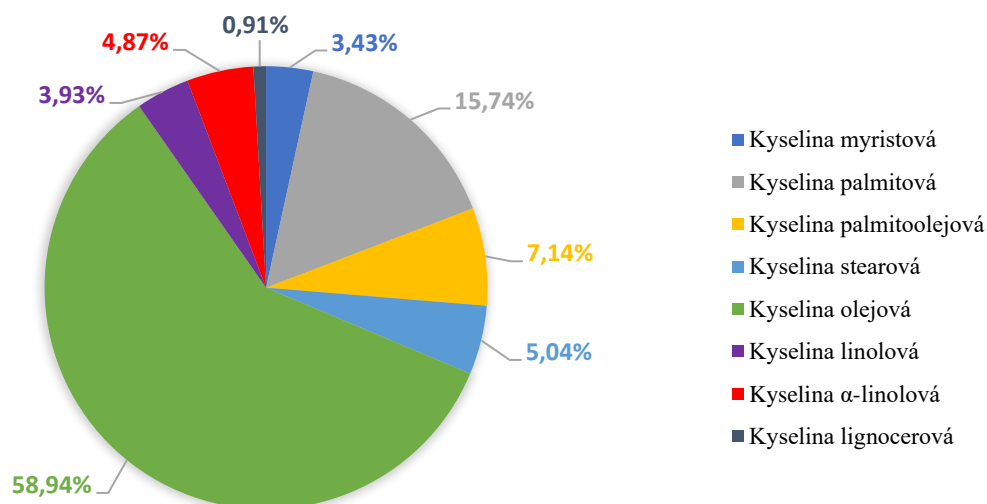
MP 149 KUK./GLU



Graf 5: Zastúpenie MK pri kmeni MP 149 kultivovanom na médiu obsahujúcom ako zdroj uhlíka kukuričné šúpolie a glukózu

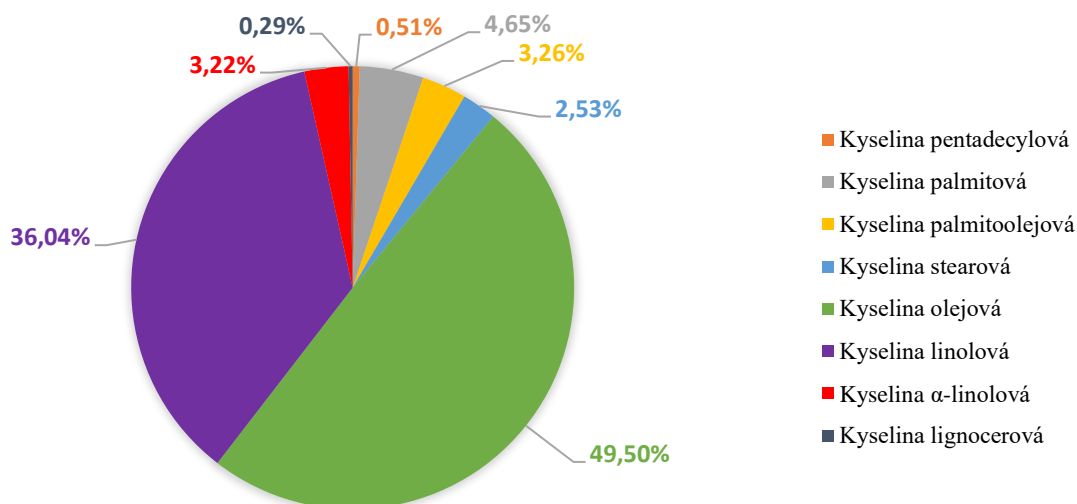
Pri kultivácii jednotlivých kmeňov na odpadných substrátoch bolo viditeľne u všetkých majoritné zastúpenie kyseliny olejovej. Pri vzorkách obsahujúcich slamu bol zaznamenaný výrazný nárast kyseliny palmitovej a palmitoolejovej.

MP 149 SLAM./GLU



Graf 6: Zastúpenie MK pri kmeni MP 149 kultivovanom na médiu obsahujúcom ako zdroj uhlíka odpad z pšeničnej slamy a glukózu

MP 149 ZEM./GLU



Graf 7: Zastúpenie MK pri kmeni MP 149 kultivovanom na médiu obsahujúcom ako zdroj uhlíka odpad zo zemiakových šupiek a glukózu

Pri kmeni *Metchnikowia pulcherrima* 149 bola pozorovaná najlepšia adaptácia na vybrané odpadné substráty. Môžeme pozorovať majoritné zastúpenie kyseliny olejovej a linolovej pri použitých médií so zemiakových šupiek s glukózou v pomere 1:1 a kukuričného šúpolia s glukózou v pomere 1:1. Pri použití pšeničnej slamy nastal rapidný pokles kyseliny linolovej. Významný podiel tvorili kyselina palmitová, palmitoolejová a stearová. Najvyšší podiel kyseliny palmitovej a olejovej vyprodukovali kmene rodu *Metchnikowia* na médiu obsahujúcom pšeničnú slamu.

Pri všetkých kvasinkových kmeňoch bolo sledované okrem celkovej produkcie lipidov aj zastúpenie nasýtených mastných kyselín (SFA), nenasýtených mastných kyselín (MUFA) a polynenasýtených mastných kyselín (PUFA) v závislosti na použitom médiu. Pri skoro všetkých vzorkách bolo pozorované majoritné zastúpenie nenasýtených mastných kyselín. Výnimku tvoril kmeň *Metchnikowia pulcherrima* 145 s médiom GLU/SLAM.

4.3.2.2 Produkcia biomasy a lipidov na kultivačných médiách s čistým odpadným substrátom

Najväčší nárast biomasy pri použití výhradne odpadných substrátov ako zdroja uhlíka, bol pri použití zemiakových šúp. Najlepšie sa na odpadné substráty adaptoval kmeň *Metchnikowia pulcherrima* 149, nedosiahlo sa síce pri tomto kmeni najvyššia produkcia lipidov ani biomasy, ale bol schopný optimálne rásť na všetkých troch vybraných odpadných substrátoch bez výrazných odchýlok v produkciách.

Z tabuľky môžeme odčítať, že produkcia lipidov sa u jednotlivých kmeňov kvasiniek nelíšia (Tabuľka 11). Produkcia lipidov nebola moc vysoká, ale bola pozorovaná u všetkých kmeňov a na každom odpadnom substráte. Najväčšia produkcia lipidov bola zaznamenaná pri vzorke MP 145 KUK a najvyššia produkcia biomasy pri vzorke MP 145 ZEM.

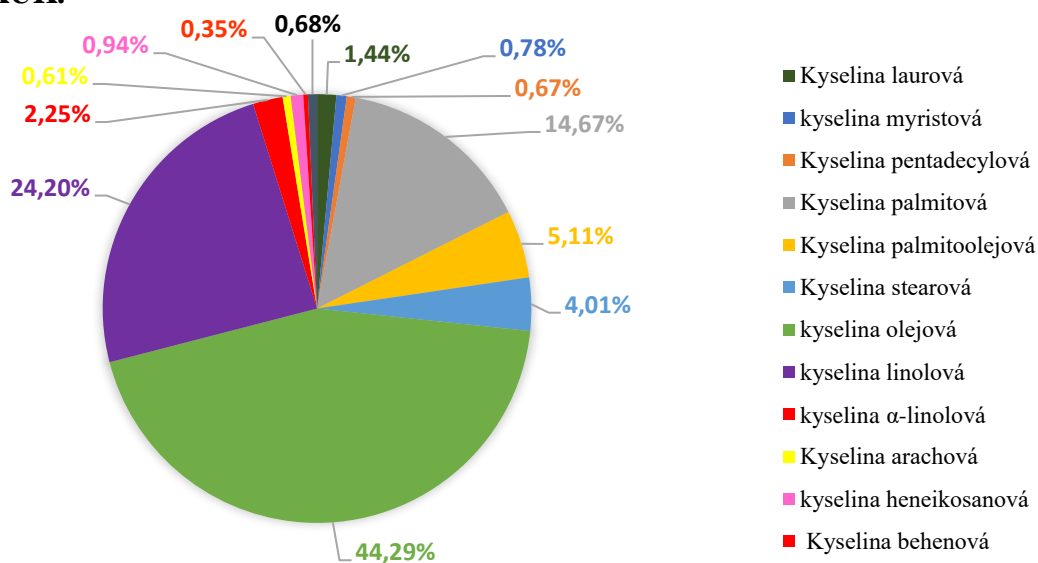
Tabuľka 11: Produkcia biomasy a percentuálne zastúpenie lipidov u jednotlivých kvasinkových kmeňoch

Kultivácia čisto s odpadným substrátom		
Kmeň	Biomasa (g/l)	Lipidy (%)
MP 147 KUK.	3,53	1,44
MP 147 SLAM.	1,25	1,21
MP 147 ZEM.	8,34	0,88
MP 147 OPT.CH.	1,70	1,80
MP 147 OPT.L.B.	1,66	1,81
MP 149 KUK.	2,38	1,58
MP 149 SLAM.	2,15	1,67
MP 149 ZEM.	7,07	1,80
MP 149 OPT.CH.	2,08	1,74
MP 149 OPT.L.B.	3,80	1,30
MF 15 KUK.	2,00	1,67
MF 15 SLAM.	1,90	1,07
MF 15 ZEM.	3,91	0,99
MF 15 OPT.CH.	1,28	1,11
MF 15 OPT. L.B.	3,78	1,30
MA 129 KUK.	3,77	1,26
MA 129 SLAM.	1,66	1,09
MA 129 ZEM.	3,85	0,79
MA 129 OPT.CH.	3,64	2,13
MA 129 OPT. L.B.	4,55	1,50
MP 145 KUK.	1,63	3,02
MP 145 SLAM.	1,55	1,21
MP 145 ZEM.	8,84	0,75
MP 145 OPT.CH.	1,20	0,27
MP 145 OPT. L.B.	1,10	1,43

Popri analýze množstva lipidov a biomasy vyprodukovaných kvasinkami bola tiež prevedená aj analýza zastúpenia jednotlivých masných kyselín.

V druhej sérii boli pri kultivácii použité média obsahujúce ako zdroj uhlíka len odpadný substrát. Boli viditeľné zmeny v zastúpení jednotlivých masných kyselín. Oproti prvej sérii, kde bola použitá ako zdroj uhlíka aj glukóza. Vyskytovalo sa pri využití len odpadných substrátov širšie spektrum vyskytujúcich sa masných kyselín. Objavila sa pri všetkých substrátoch aj kyselina laurová a heneikosanova.

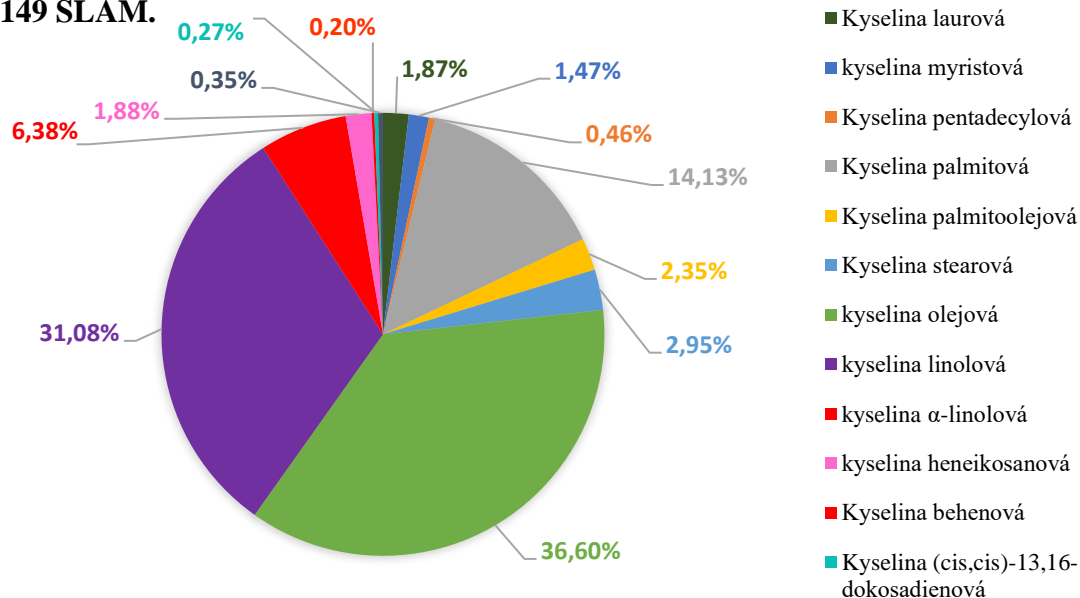
MP 149 KUK.



Graf 8: Zastúpenie MK pri kmeni MP 149 kultivovanom na médiu obsahujúcom ako zdroj uhlíka odpad z kukuričného šúpolia

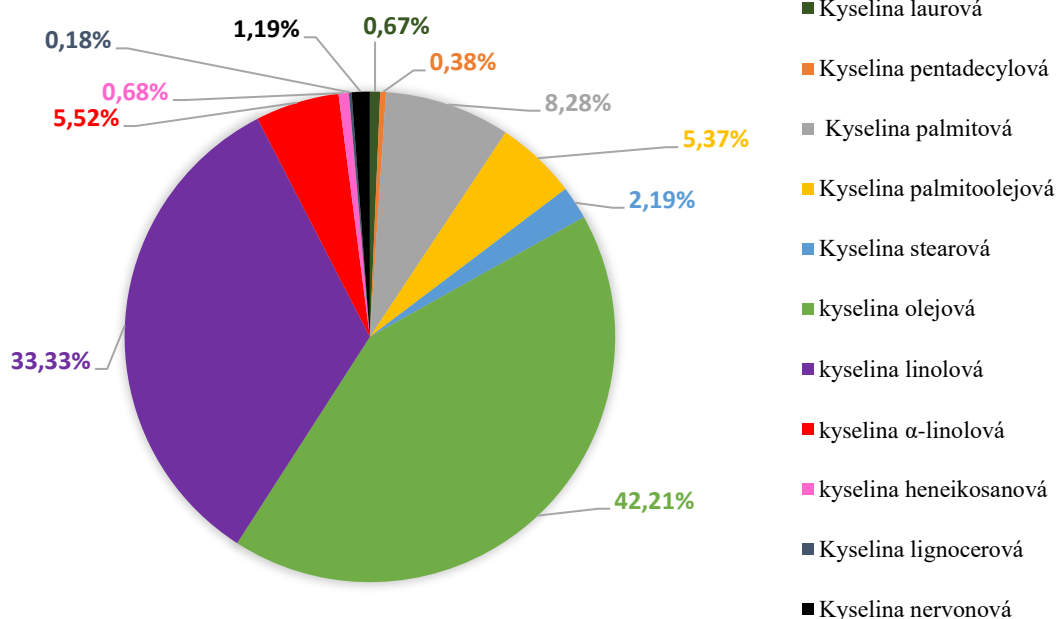
Najvyšší podiel kyseliny olejovej a palmitovej bol pozorovaný pri kmeňoch, kde bol použitý ako zdroj uhlíka odpad z kukuričného šúpolia. Výrazný pokles kyseliny palmitovej bol pozorovaný pri využití odpadu zo zemiakových šupiek. Pri použití pšeničnej slamy ako zdroja uhlíka bol pozorovaný výrazný nárast zastúpenia kyseliny α -linolovej oproti ostatným odpadným substrátom.

MP 149 SLAM.



Graf 9: Zastúpenie MK pri kmeni MP 149 kultivovanom na médiu obsahujúcom ako zdroj uhlíka odpad z pšeničnej slamy

MP 149 ZEM.

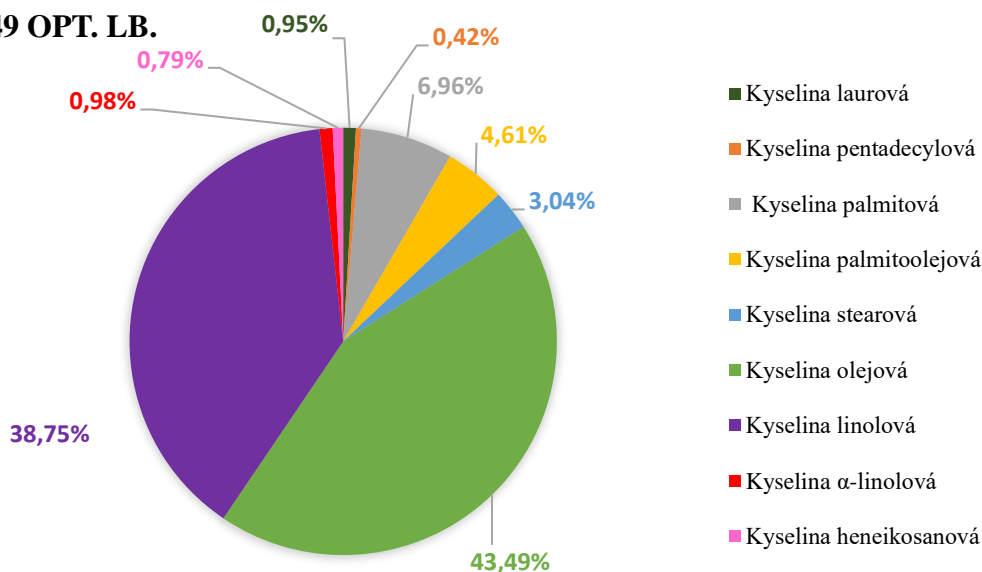
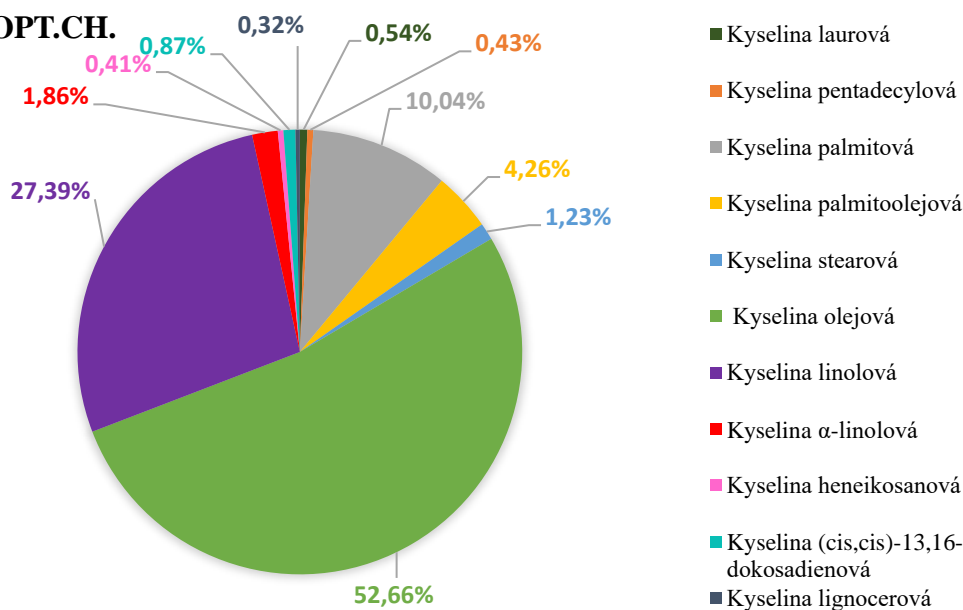


Graf 10: Zastúpenie MK pri kmeni MP 149 kultivovanom na médiu obsahujúcom ako zdroj uhlíka odpad zo zemiakových šupiek

Bolo sledované okrem celkovej produkcie lipidov aj zastúpenie nasýtených mastných kyselín (SFA), nenasýtených mastných kyselín (MUFA) a polynenasýtených mastných kyselín (PUFA) v závislosti na použitom médiu pri jednotlivých kvasinkových kmeňoch. Pri použití výhradne odpadného substrátu ako zdroja uhlíka boli pozorované zmeny v zastúpení SFA, MUFA a PUFA. Vo väčšine bol pozorovaný najvyšší pomer nenasýtených mastných kyselín. Hlavne pri kmene *Metschnikowia pulcherrima* 149 a pri ostatných kmeňoch pri použití kukuričného šúpolia ako zdroja uhlíka. Najväčšie zastúpenie polynenasýtených mastných kyselín bolo pozorované pri použití zemiakových šupiek ako zdroja uhlíka, pri kmeňoch *Metschnikowia pulcherrima* 145 a *Metschnikowia andauensis* 129. Pri použití pšeničnej slamy bolo pozorované majoritné zastúpenie nasýtených mastných kyselín.

4.3.3 Zastúpenie mastných kyselín v závislosti na teplote

Pri zníženej teplote sa prejavil u všetkých kmeňov vplyv teploty na zastúpenie mastných kyselín v mikrobiálnych lipidoch. Z tabuliek v prílohe je možné pozorovať zvýšené množstvo nasýtených mastných kyselín vo všetkých médiách kultivovaných v prostredí laboratórnej teploty. Naopak, nízka teplota sa ukázala ako podporujúci faktor zvýšenia práve polynenasýtených mastných kyselín skoro vo všetkých sledovaných kultiváciách.

MP 149 OPT. LB.**MP 149 OPT.CH.**

Graf 11 a 12: Zastúpenie MK pri kmeni MP 149 kultivovanom pri laboratórnej teplote a zníženej teplote

Na názorne zobrazenom profile MK kvasinky *M. pulcherrima* 149 (Graf 11 a 12) vidieť, že majoritné zastúpenie lipidov vyprodukovaných pri oboch teplotných režimoch mala kyselina olejová. Avšak pri použití nízkej teploty je vidieť výrazný nárast kyseliny palmitovej v porovnaní s kultiváciou za laboratórnej teploty. Navyše, teplotný režim so zníženou teplotou pozitívne ovplyvnil aj zastúpenie kyseliny α -linolovej a olejovej. Znížená teplota podporila produkciu polynenasýtených mastných kyselín.

5 ZÁVER

Predložená bakalárska práca sa zaoberá produkciou mikrobiálnych lipidov prostredníctvom vybraných kmeňov rodu *Metschnikowia*, za využitia dostupných odpadných škrobových substrátov z potravinárskej výroby. Boli vybrané 3 druhy odpadných škrobových substrátov: zemiakové šupy, kukuričné šúpolie a pšeničná slama. V rámci práce bol sledovaný vplyv odpadných substrátov na produkciu biomasy a lipidov. Boli prevedené dve série kultivácie, pri prvej sérii sa použil ako zdroj uhlíka odpadný substrát s glukózou a v druhej sérii sa testovalo použitie len odpadného substrátu ako zdroja uhlíka. Počas práce boli sledované aj rastové charakteristiky vybraných kmeňov kvasiniek na optimálnom médiu pri laboratórnej a zníženej teplote.

Študované kmene boli schopné rásť na vybraných odpadných substrátoch a produkovať mikrobiálne lipidy. Výťažnosť na odpadných substrátoch bola nízka. Najvyššia produkcia lipidov bola zaznamenaná pri kmeni *Metschnikowia pulcherrima* 149 pri prvej sérii kultivácie na zemiakových šupkách, čo predstavovalo 4,20 %. Pri použití čisto odpadného substrátu bola najväčšia produkcia lipidov pri kmeni *Metschnikowia pulcherrima* 145 na kukuričných šupkách, čo činilo 3,02 %. Pri tejto vzorke bola zaznamenaná najvyššia produkcia lipidov, ale nízka produkcia biomasy. Všetky študované kmene mali všeobecne nižšie produkcie biomasy v porovnaní s optimálnym médiom. Môže to byť dôsledok využívania škrobnatých substrátov, ktoré neboli predom upravené hydrolýzou. Najvyššia produkcia biomasy u všetkých kmeňov bola zaznamenaná pri použití zemiakových šúp ako zdroja uhlíka. Zastúpenie mastných kyselín u vybraných kmeňov kvasiniek sa prejavilo majoritným zastúpením C16 a C18 mastných kyselín, čo indikuje ich potenciál využitia v potravinárskom priemysle. Toto využitie kvasiniek na produkciu mikrobiálnych lipidov s využitím odpadných substrátov by malo význam z environmentálneho hľadiska. Z kultivácií na odpadnom zemiakovom substráte bolo vidieť i pekné produkcie mastných kyselín zo skupiny PUFA, v porovnaní s inými použitými odpadnými substrátmi. Tieto mastné kyseliny tvoria nevyhnutnú zložku ľudskej výživy. Odlišnosti v produkcii mastných kyselín na jednotlivých médiách u jednotlivých kmeňov by teda mohli pravdepodobne súvisieť s genetickou výbavou využívaných kvasiniek. Vzájomné porovnávanie výsledkov práce dokazuje, že odpadný substrát, teplotné podmienky, daný kvasinkový kmeň a samotná doba kultivácie výrazne ovplyvňujú produkciu lipidov v oleogénnych kvasinkách.

Ďalšou optimalizáciou kultivačného procesu by mohla byť dosiahnutá vyššia výťažnosť biomasy aj produkcie lipidov. A dostupnosť škrobových odpadných substrátov a ich nízka cena by mohla znížiť náklady spojené s kultiváciou.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Vyd. 3., Brno: VUT, 2004. ISBN 80-214-2567-9.
- [2] VYTRÁSOVÁ, Jarmila, Z. Bílková: *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*, Vyd.1., Pardubice: Univerzita Pardubice, 1999. ISBN 80-7194-174-3.
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy*. Vyd. 1., Bratislava: Alfa, 1982.
- [4] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7.
- [5] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 2., Praha: Victoria publishing, 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [6] VOET, Donald, J.G.Voetová, *Biochemie*, Vyd. 1., Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [7] WALKER, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester, New York: J. Wiley & Sons, 1998. ISBN 978-0-471-96446-9.
- [8] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov*. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-050-0644-6.
- [9] LACHANCE, Marc-André. *Metschnikowia: half tetrads, a regicide and the fountain of youth*. *Yeast*. 2016, 33(11), 563-574. DOI: 10.1002/yea.3208. ISSN 0749503X.
- [10] PITT, J. I. and M. W. Miller, *Sporulation in Candida pulcherrima, Candida reukaufii and Chlamydozoma species: their relationships with Metschnikowia*. *Mycologia*. 1968, 663-685. DOI: 10.2307/3757434.
- [11] ATSUMI, S., T. Hanai, and J.C. Liao, *Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels*. *Nature*, 2008, 451(7174), 86-U13. DOI: 10.1038/nature06450.
- [12] KLUYVER, A.J., J.P. Vanderwalt, and A.J. Vantriet, *Pulcherrimin, the Pigment of Candida Pulcherrima*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1953, 39(7), 583-593.
- [13] WHIFFIN, F., F. Santomauro, and C.J. Chuck, *Toward a microbial palm oil substitute: oleaginous yeasts cultured on lignocellulose*. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, 2016. 10(3), 316-334.
- [14] LAOTENG, K, Certik M, Cheevadhanark S : Mechanisms controlling lipid accumulation and polyunsaturated fatty acid synthesis in oleaginous fungi. *Chemical Papers* 65, 2011, (2), 97-103, DOI:10.2478/s11696-010-0097-4.
- [15] RATLEDGE, C., *Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms: Colloquium on Regulation of Fatty Acid Synthesis*. Cardiff, Wales, Jul 16-18 2002. 1047-1050.
- [16] RATLEDGE, C., *Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production*. *Biochimie*, 2004. 86 (11), 807-815.
- [17] ROSSI, Maddalena, Amaretti A, Raimondi S, Leonardi A , *Getting lipids for biodiesel - Production from oleaginous fungi*, Stoytcheva M, Montero G (eds.). *Biodiesel - Feedstocks and processing technologies*, Rijeka: InTech, 2011, 71-92 .

- DOI: 10.5772/25864.
- [18] KOGANTI, S., et al., *Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield*. Applied microbiology and biotechnology, 2011,90(1), 257-267. DOI:10.1007/s00253-010-3015-3.
 - [19] HUA, D.L. and P. Xu, *Recent advances in biotechnological production of 2phenylethanol*, Biotechnology Advances, 2011. 29(6), 654-660. DOI:10.1016/j.biotechadv.2011.05.001.
 - [20] DEAK, Tibor. Handbook of food spoilage yeasts. Vyd 2, Boca Raton : CRC Press, 2007. ISBN 9781420044942.
 - [21] WANG, Chen, Yang LIU, Tao-tao ZHANG, Cai-ge LU, Ya LIU, Dian-peng ZHANG a Wei-cheng LIU. *Metschnikowia persici sp. nov., A Novel Protease-Producing Yeast Species from China*. Current Microbiology,2007, 74(3), 365-370. DOI: 10.1007/s00284-017-1194-1.ISSN 0343-8651.
 - [22] TÜRKEK, Sezai. *Isolation and characterization of new Metschnikowia pulcherrima strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin*. Zeitschrift für Naturforschung. C, A journal of biosciences [online]. 2009, 64(5-6), 405-410. ISSN 0939-5075.
 - [23] FILIP, Jiří. *Odpadové hospodářství*. Vyd. 1., Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2002. ISBN 80-7157-608-5.
 - [24] HOWARD, R.L. et al., *Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production*. African Journal of Biotechnology, 2003, 2 (12), 602-619. ISSN 1684–5315.
 - [25] SUNDARAM, Priyadharshni Vairava, Jayanthi SINGARAM a Thirulogachandar ASHOKAN. Detoxification of food-waste hydrolysate to enhance lipid production in M. pulcherrima- an alternative feedstock for biodiesel. International Journal of Environment and Sustainable Development. 2018, 17(2/3). DOI: 10.1504/IJESD.2018.094026. ISSN 1474-6778. Dostupné také z: <http://www.inderscience.com/link.php?id=94026>
 - [26] SAHA, B. C., Cotta M. A.,*Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw*. Biotechnol. Prog., 2006, 22, 449-453.
 - [27] FAN, Jiajun, Fabio SANTOMAURO, Vitaliy L. BUDARIN, et al.. The additive free microwave hydrolysis of lignocellulosic biomass for fermentation to high value products. Journal of Cleaner Production, 2018, 198, 776-784. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.07.088. ISSN 09596526. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652618320614>
 - [28] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2., opr. Vyd., Praha: Academia, 1996, Dotisk 2007. ISBN 978-80-200-0600-4.
 - [29] CERTIK, M. a S. Shimizu. *Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(1), 1-14.
 - [30] CHEIRSILP, B. a Y. Louhasakul. *Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel*, Bioresource Technology,2013. 142(1), 329-337.

- [31] AMARETTI, A., et al. *Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast Rhodotorula Glacialis*. Microbial Cell Factories, 2010, Zv.9, 73. <http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/73>.
- [32] SANTAMAURO, Fabio, Fraeya M WHIFFIN, Rod J SCOTT, Christopher J CHUCK, M. ANTONUCCI, C. TRUZZI, G. SCARPONI a M. CIANI. *Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources*, Biotechnology for Biofuels, 2014. 7(1), 34-. DOI: 10.1186/1754-6834-7-34. ISSN 1754-6834.
- [33] CANONICO, L., S. ASHOOR, M. TACCARI, F. COMITINI, M. ANTONUCCI, C. TRUZZI, G. SCARPONI a M. CIANI. *Conversion of raw glycerol to microbial lipids by new Metschnikowia and Yarrowia lipolytica strains*, Annals of Microbiology, 2016. 66(4), 1409-1418. DOI: 10.1007/s13213-016-1228-0. ISSN 1590-4261.
- [34] TACCARI, Manuela, Laura CANONICO, Francesca COMITINI, Ilaria MANNAZZU a Maurizio CIANI. *Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production*, Bioresource Technology, 2012. 110, 488-495. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.109. ISSN 09608524.
- [35] L.X. PAN et al.: *Isolation of Oleaginous Yeasts*, Food Technol, Biotechnol, 2009. 47 (2), 215– 220.
- [36] CHUCK, Christopher, Fabio SANTOMAURO a Roderick SCOTT. *Method of increasing lipid accumulation in Metschnikowia pulcherrima cells*. European patent application, WO2014122439A1. Udelené 14.8.2014.
- [37] ABELN, Felix, Jiajun FAN, Vitaliy L. BUDARIN, et al.. *Lipid production through the single-step microwave hydrolysis of macroalgae using the oleaginous yeast Metschnikowia pulcherrima*, Algal Research, 2019. 38. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101411. ISSN 22119264.
- [38] PARSONS, Sophie, Felix ABELN, Marcelle C MCMANUS a Christopher J CHUCK. *Techno-economic analysis (TEA) of microbial oil production from waste resources as part of a biorefinery concept: assessment at multiple scales under uncertainty*, Journal of chemical technology and biotechnology, 2019. 94(3), 701-711. DOI: 10.1002/jctb.5811. ISSN 02682575.
- [39] CAGÁŇOVÁ, Linda. *Využití odpadních substrátů k produkci lipidických látek kvasinkami rodu Metschnikowia*. Brno, 2019

ZOZNAM SKRATIEK

GC	plynová chromatografia
GLU	glukóza
MK	mastné kyseliny
MA129	Metschnikowia andauensis CCY 029-002-129
MF15	Metschnikowia fructicola CCY 029-002-15
MP145	Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-145
MP147	Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-147
MP149	Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-149
MUFA	mononenasýtené mastné kyseliny
PUFA	polynenasýtené mastné kyseliny
SFA	nasýtené mastné kyseliny
ZEM.	zemiakové šupy v médiu
KUK.	kukuričné šúpolie v médiu
SLAM.	pšeničná slama v médiu
OPT.CH.	inkubované pri zníženej teplote vo vinárni
OPT.L.B.	inkubované pri laboratórnej teplote

PRÍLOHY

Percentuálne zastúpenie MK u jednotlivých kmeňov

Tabuľka 11: Percentuálne zastúpenie nasýtených (SFA), mononenasýtených (MUFA) a polynenasýtených (PUFA) MK u jednotlivých kvasinkových kmeňov pri kultivácii na médiu tvorenom z glukózy a odpadného substrátu v pomere 1:1

Kmeň	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
MP 147 KUK.	16,94	46,89	36,16
MP 147 SLAM.	19,04	38,88	42,09
MP 147 ZEM.	25,79	65,98	8,23
MP 147 OPT.CH.	13,78	58,84	27,39
MP 147 OPT. L.B.	20,45	74,77	4,78
MP 149 KUK.	18,54	44,57	36,89
MP 149 SLAM.	25,12	66,08	8,80
MP 149 ZEM.	7,83	53,65	38,51
MP 149 OPT.CH.	14,02	81,06	4,92
MP 149 OPT. L.B.	15,26	81,57	3,17
MF 15 KUK.	24,20	51,10	24,70
MF 15 SLAM.	54,61	22,87	22,52
MF 15 ZEM.	33,94	35,50	30,56
MF 15 OPT.CH.	11,33	55,15	33,53
MF 15 OPT. L.B.	20,63	69,77	9,59
MA 129 KUK.	15,55	58,55	25,90
MA 129 SLAM.	21,26	50,20	28,55
MA 129 ZEM.	10,49	63,71	25,80
MA 129 OPT.CH.	14,79	80,66	4,55
MA 129 OPT. L.B.	14,35	81,33	4,32
MP 145 KUK.	33,48	54,67	11,85
MP 145 SLAM.	24,90	63,67	11,42
MP 145 ZEM.	13,58	0,00	86,42
MP 145 OPT.CH.	19,79	67,98	12,23
MP 145 OPT. L.B.	20,30	77,09	2,61

Tabuľka 12: Percentuálne zastúpenie nasýtených (SFA), mononenasýtených (MUFA) a polynenasýtených (PUFA) MK u jednotlivých kvasinkových kmeňov pri kultivácii na médiu tvorenom iba z odpadného substrátu

Kmeň	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
MP 147 KUK.	31,02	49,23	19,75
MP 147 SLAM.	38,02	28,97	33,02
MP 147 ZEM.	25,33	34,21	40,47
MP 147 OPT.CH.	12,32	46,87	40,81
MP 147 OPT. L.B.	10,67	48,88	40,45
MP 149 KUK.	24,14	49,40	26,45
MP 149 SLAM.	23,31	38,96	37,74
MP 149 ZEM.	12,38	48,77	38,85
MP 149 OPT.CH.	12,09	48,45	39,47
MP 149 OPT. L.B.	12,97	56,92	30,11
MF 15 KUK.	33,56	42,57	23,88
MF 15 SLAM.	34,52	26,55	38,93
MF 15 ZEM.	37,47	28,21	34,32
MF 15 OPT.CH.	16,37	53,19	30,44
MF 15 OPT. L.B.	12,80	63,86	23,34
MA 129 KUK.	27,76	48,04	24,20
MA 129 SLAM.	31,76	39,14	29,10
MA 129 ZEM.	19,20	38,44	42,36
MA 129 OPT.CH.	10,15	51,06	38,79
MA 129 OPT. L.B.	14,14	54,57	31,30
MP 145 KUK.	26,10	47,56	26,33
MP 145 SLAM.	37,55	30,63	31,81
MP 145 ZEM.	29,92	26,66	43,42
MP 145 OPT.CH.	69,66	11,12	19,22
MP 145 OPT. L.B.	60,11	34,30	5,59

Vplyv použitého substrátu na profil MK

Tabuľka 13: Percentuálne zastúpenie vybraných MK v MP 147

	MP 147 KUK.		MP 147 SLAM.		MP 147 ZEM.		MP 147 OPT.CH.		MP 147 OPT. L.B.	
MK	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad
Kyselina stearová	5,28 %	4,82 %	3,45 %	4,40 %	6,32 %	4,57 %	1,71 %	2,82 %	2,11 %	2,97 %
Kyselina palmitová	8,29 %	19,26 %	11,37 %	20,26 %	16,14 %	13,92 %	11,65 %	6,99 %	16,45 %	7,10 %
Kyselina olejová	42,27 %	45,66 %	32,55 %	26,92 %	58,25 %	29,39 %	39,29 %	41,12 %	61,28 %	41,98 %
Kyselina palmitoolejová	3,03 %	2,56 %	6,32 %	2,05 %	7,73 %	3,83 %	6,32 %	5,61 %	10,59 %	5,94 %
Kyselina linolová	32,78 %	18,43 %	38,22 %	28,18 %	2,47 %	34,46 %	27,39 %	39,80 %	2,12 %	38,71 %
Kyselina α - linolová	2,59 %	1,32 %	3,28 %	4,84 %	3,65 %	6,00 %	–	1,01 %	2,67 %	1,12 %

Tabuľka 14: Percentuálne zastúpenie vybraných MK v MP 149

	MP 149 KUK.		MP 149 SLAM.		MP 149 ZEM.		MP 149 OPT.CH.		MP 149 OPT. L.B.	
MK	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad
Kyselina stearová	3,94 %	4,01 %	5,04 %	2,95 %	2,48 %	2,19 %	–	3,02 %	2,17 %	1,23 %
Kyselina palmitová	10,72 %	14,67 %	15,74 %	14,13 %	4,56 %	8,28 %	12,47 %	6,91 %	8,68 %	10,04 %
Kyselina olejová	40,25 %	44,29 %	58,94 %	36,60 %	48,57 %	42,21 %	69,27 %	43,19 %	66,65 %	52,66 %
Kyselina palmitoolejová	4,32 %	5,11 %	7,14 %	2,35 %	3,20 %	5,37 %	7,80 %	4,58 %	6,28 %	4,26 %
Kyselina linolová	34,26 %	24,20 %	3,93 %	31,08 %	35,36 %	33,33 %	2,86 %	38,49 %	1,96 %	27,39 %
Kyselina α - linolová	2,64 %	2,25 %	4,87 %	6,38 %	3,16 %	5,52 %	2,06 %	0,98 %	1,21 %	1,86 %

Tabuľka 15: Percentuálne zastúpenie vybraných MK v MP 145

	MP 145 KUK.		MP 145 SLAM.		MP 145 ZEM.		MP 145 OPT.CH.		MP 145 OPT. L.B.	
MK	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad
Kyselina stearová	6,88 %	9,74 %	3,56 %	3,77 %	3,84 %	4,49 %	6,14 %	2,55 %	3,16 %	1,21 %
Kyselina palmitová	24,67 %	15,71 %	9,88 %	24,45 %	5,28 %	18,42 %	13,65 %	6,02 %	15,15 %	27,15 %
Kyselina olejová	55,67 %	48,25 %	41,38 %	28,83 %	46,39 %	25,02 %	57,19 %	43,08 %	67,92 %	18,77 %
Kyselina palmitoolejová	–	3,07 %	–	1,80 %	2,59 %	1,64 %	6,96 %	3,78 %	9,17 %	15,52 %
Kyselina linolová	8,00 %	16,80 %	40,78 %	26,50 %	39,40 %	31,96 %	12,23 %	42,13 %	–	4,38 %
Kyselina α - linolová	3,85 %	2,32 %	3,83 %	5,32 %	1,66 %	11,46 %	–	–	2,61 %	1,21 %

Tabuľka 16: Percentuálne zastúpenie vybraných MK v MA 129

	MA 129 KUK.		MA 129 SLAM.		MA 129 ZEM.		MA 129 OPT.CH.		MA 129 OPT. L.B.	
MK	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad
Kyselina stearová	3,70 %	4,93 %	3,69 %	3,62 %	3,83 %	5,38 %	2,08 %	1,41 %	1,93 %	1,15 %
Kyselina palmitová	7,45 %	11,62 %	12,80 %	17,69 %	4,83 %	9,95 %	11,08 %	7,48 %	10,29 %	10,77 %
Kyselina olejová	47,66 %	42,18 %	46,40 %	32,65 %	53,37 %	32,95 %	60,67 %	41,16 %	67,74 %	48,52 %
Kyselina palmitoolejová	3,72 %	3,63 %	3,79 %	2,20 %	8,02 %	5,19 %	12,14 %	9,90 %	9,36 %	6,05 %
Kyselina linolová	23,63 %	22,32 %	25,28 %	24,72 %	24,54 %	39,04 %	1,90 %	36,76 %	1,82 %	29,22 %
Kyselina α - linolová	2,27 %	1,88 %	3,26 %	4,38 %	1,27 %	3,32 %	2,65 %	2,03 %	2,50 %	2,08 %

Tabuľka 17: Percentuálne zastúpenie vybraných MK v MF 15

	MF 15 KUK.		MF 15 SLAM.		MF 15 ZEM.		MF 15 OPT.CH.		MF 15 OPT. L.B.	
MK	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad	G s odpadom	Čistý odpad
Kyselina stearová	6,53 %	4,54 %	4,51 %	3,39 %	3,50 %	4,63 %	1,99 %	2,26 %	9,74 %	0,27 %
Kyselina palmitová	12,89 %	18,09 %	31,71 %	22,01 %	24,55 %	24,38 %	7,18 %	8,79 %	15,71 %	8,88 %
Kyselina olejová	46,20 %	37,14 %	20,91 %	25,19 %	31,89 %	26,38 %	49,98 %	49,27 %	48,25 %	61,69 %
Kyselina palmitoolejová	4,90 %	5,43 %	1,96 %	1,36 %	3,61 %	1,84 %	4,11 %	3,91 %	3,07 %	2,16 %
Kyselina linolová	22,25 %	20,90 %	16,80 %	29,51 %	26,76 %	29,37 %	30,54 %	27,87 %	16,80 %	22,05 %
Kyselina α - linolová	2,45 %	2,97 %	5,72 %	9,42 %	3,80 %	4,95 %	2,99 %	2,56 %	2,32 %	1,29 %